GERALDO MAGELA NOGUEIRA MARQUES

**Efeito da pentoxifilina e da solução salina hipertônica na
isquemia/reperfusão intestinal e suas consequências no
pulmão: estudo experimental em ratos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Clínica Cirúrgica

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Edna Frasson de
Souza Montero

SÃO PAULO

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Marques, Geraldo Magela Nogueira

Efeito da pentoxifilina e da solução salina hipertônica na isquemia/reperfusão intestinal e suas consequências no pulmão : estudo experimental em ratos / Geraldo Magela Nogueira Marques. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Clínica Cirúrgica.

Orientadora: Edna Frasson de Souza Montero.

Descritores: 1.Reperfusão 2.Solução salina hipertônica 3.Pentoxifilina 4.Isquemia 5.Apoptose 6.Inflamação

USP/FM/DBD-264/12

Esta tese está de acordo com as seguintes normas em vigor no momento desta publicação:

Referências: Adaptado *do International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Annelise Carneiro de Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena.

@a Ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Dedicatória

Aos meus filhos, **Luiz Guilherme e João Eduardo**

Pelo apoio e pelo carinho

Pela compreensão nas horas distante de vocês

Pelo amor que sempre tivemos uns pelos outros

Pela certeza de serem a maior obra que já realizei em minha vida

“Filho é um ser que nos emprestaram para um curso intensivo de como amar alguém além de nós mesmos, de como mudar nossos piores defeitos para darmos os melhores exemplos e de aprendermos a ter coragem. Isto mesmo ! Ser pai ou mãe é o maior ato de coragem que alguém pode ter, porque é se expor a todo tipo de dor, principalmente da incerteza de estar agindo corretamente e do medo de perder algo tão amado. Perder? Como? Não é nosso, recordam-se? Foi apenas um empréstimo”.

(José Saramago)

“Bendito aquele que consegue dar aos seus filhos asas e raízes”,
diz um provérbio.
Precisamos das raízes: existe um lugar no mundo onde nascemos, aprendemos uma língua, descobrimos como nossos antepassados superavam seus problemas. Em um dado momento, passamos a ser responsáveis por este lugar.
Precisamos das asas: elas nos mostram os horizontes sem fim da imaginação, nos levam até nossos sonhos, nos conduzem a lugares distantes. São as asas que nos permitem conhecer as raízes de nossos semelhantes, e aprender com eles.
Bendito quem tem asas e raízes; e pobre de quem tem apenas um dos dois.

(Paulo Coelho)

In Memoriam...

Prof.ª Dr.ª Maria Christina Anna Grieger

Minha mestra... Você imprimiu sentido à minha vida de médico. A simples lembrança da sua imagem me traz a importância de servir com ética e devoção.

Prof. Dr. Luiz Francisco Poli de Figueiredo

Serei eternamente grato pela confiança em mim depositada. Tudo em que eu precisava acreditar era que eu sou capaz. E você acreditou nisso muito antes de mim!!!

Agradecimientos

A Deus

Pelo que representa em minha vida

Pela fonte inesgotável de força e esperança

Louvai ao SENHOR. Louvai a Deus no seu santuário; louvai-o no firmamento do seu poder. Louvai-o pelos seus atos poderosos; louvai-o conforme a excelência da sua grandeza. Louvai-o com o som de trombeta; louvai-o com o saltério e a harpa. Louvai-o com o tamborim e a dança, louvai-o com instrumentos de cordas e com órgãos. Louvai-o com os címbalos sonoros; louvai-o com címbalos altissonantes. Tudo quanto tem fôlego louve ao SENHOR. Louvai ao SENHOR.

(Salmo 150)

Aos meus pais, **Antonio** e **Dora**, por terem me carregado no colo desde muito pequeno.... até hoje! Pela força que sinto quando baixam os olhos sobre mim.

Por terem me criado para enfrentar a vida sempre de cabeça erguida.

Por terem me feito flecha!

“Vossos filhos não são vossos filhos.

São os filhos e as filhas da ânsia da vida por si mesma.

Vêm através de vós, mas não são de vós.

E embora vivam convosco, não vos pertencem.

Podeis outorgar-lhes vosso amor, mas não vossos pensamentos,

Porque eles têm seus próprios pensamentos.

Podeis abrigar seus corpos, mas não suas almas;

Pois suas almas moram na mansão do amanhã,

Que vós não podeis visitar nem mesmo em sonho.

Podeis esforçar-vos por ser como eles, mas não procureis fazê-los como vós,

Porque a vida não anda para trás e não se demora com os dias passados.

Vós sois os arcos dos quais vossos filhos são arremessados como flechas vivas.

O arqueiro mira o alvo na senda do infinito, e vos estica com toda a sua força
Para que suas flechas se projetem, rápidas e para longe.
Que vosso encurvamento na mão do arqueiro seja vossa alegria:
Pois assim como ele ama a flecha que voa,
Ama também o arco que permanece estável.”

(Gibran Khalil Gibran)

Aos meus **irmãos, cunhada e sobrinhos**, por ficarem por perto e servirem
de apoio nos momentos em que precisei e nos em que não precisei
também...

“O que vale na vida não é o ponto de
partida e sim a caminhada. Caminhando e
semeando, no fim terás o que colher.”

(Cora Coralina)

Aos meu enteados, **Juliana e Felipe**, e à minha neta **Olívia**, pela alegria
desse encontro.

“Durante a nossa vida conhecemos
pessoas que vem e que ficam, outras que
vem e passam. Existem aquelas que vem,
ficam e depois de algum tempo se vão.
Mas existem aquelas que vem e se vão com
uma enorme vontade de ficar...”

(Charles Chaplin)

Ao **Marcos Pereira Araujo**, pela dedicação e pela paciência, pelo apoio sempre acompanhado de um sorriso, por sacrificar seus momentos em função dos meus, pelas horas passadas em leituras intermináveis de cada texto escrito.

“Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhar as mesmas recordações.

Pois boas lembranças, são marcantes, e o que é marcante nunca se esquece! Uma grande amizade, mesmo com o passar do tempo, é cultivada assim!”

(Vinicius de Moraes)

Ao **Prof. Dr. Flávio Saad**, pela persistência em ser professor, por me formar cirurgião pediátrico e me mostrar os bons caminhos que tenho trilhado na minha carreira.

O Mestre na arte da vida faz pouca distinção entre o seu trabalho e o seu lazer, entre a sua mente e o seu corpo, entre a sua educação e a sua recreação, entre o seu amor e a sua religião. Ele dificilmente sabe distinguir um corpo do outro. Ele simplesmente persegue sua visão de excelência em tudo que faz, deixando para os outros a decisão de saber se está trabalhando ou se divertindo. Ele acha que está sempre fazendo as duas coisas simultaneamente.

(Texto budista)

Agradecimentos especiais

À **Prof.^a Dr.^a Edna Frasson de Souza Montero**, Professora Associada e Livre Docente da Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo – FMUSP, Vice-coordenadora do Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica – FMUSP; Livre Docente da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina. Obrigado pelas orientações, por ter me ajudado muito na elaboração desta tese e por ter aceitado dar continuidade à orientação do meu trabalho. Agradeço a Deus por tê-la colocado em meu caminho.

Aos biólogos **Juliana Gonçalves Carvalho**, MSc., e **Thiago Simão Gomes**, MSc. e doutorando do departamento de Patologia no Laboratório de Patologia Molecular da UNIFESP, por todo apoio na realização dos estudos histológicos e imuno-histoquímicos. Sem vocês seria difícil levar essa empreitada a termo. Agradeço pela força de vontade, pelo altruísmo e pelo desprendimento.

À **Prof.^a Dr.^a Celina Tizuko Fujiyama Oshima**, pesquisadora responsável pelo Laboratório de Patologia Molecular da UNIFESP, pelo apoio e generosidade na realização das lâminas de imuno-histoquímica.

Ao amigo e pós-graduando **Alessandro Rodrigo Belon**, pelo companheirismo, pelo apoio e pelas longas conversas tentando encontrar o melhor caminho na realização de nossos projetos.

À **Dr.^a Junko Takano Osaka**, pelos bons conselhos, pela presteza em servir. Conhecê-la foi um dos grandes ganhos que tive nesse período de estudos.

À **Eliane Falconi Monico Gazzetto**, sempre atenta a todos os prazos do meu projeto. Sua capacidade de organização foi de extrema valia.

Ao **Sr. Elias Aparecido Marcelino** que tão gentilmente cuidou dos animais utilizados nesta tese. Obrigado pela dedicação e pelo companheirismo.

Aos professores **Leda Viegas de Carvalho, Murched Omar Taha e Flávio Henrique F. Galvão** pelas importantes contribuições na qualificação deste trabalho.

Aos amigos que fiz na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sempre atentos às minhas necessidades e sempre prontos a ajudar com um belo sorriso estampado nos lábios:

Cláudio Antonio Vidotti

Dulcinéia Mariano

Elisabete Hiroe Minami

Jonélia Souza de Perez

Marco de Luna

Marina Takeda Milane

Mario Matsuo Itinoshi

Ourisval Santana Santos

Sandra Maria da Silva Oliveira

Sérgio Murilo de Mello Borges

Vanda de Almeida Novaes

Sumário

Dedicatória

Agradecimentos

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de figuras

Lista de quadros

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	9
3	MÉTODOS.....	10
	3.1 Modelo animal.....	10
	3.2 Histologia.....	14
	3.3 Imuno-histoquímica.....	16
	3.4 Análise estatística.....	20
4	RESULTADOS.....	21
	4.1 Avaliação funcional.....	21
	4.2 Avaliação histológica em HE.....	24
	4.3 Avaliação imuno-histoquímica.....	27
	4.3.1 Avaliação da atividade de COX 2.....	27
	4.3.2 Avaliação da apoptose.....	31
	4.3.2.1 Avaliação da atividade de caspase-3 clivada....	31
	4.3.2.2 Avaliação da atividade de Bcl-2.....	35
5	DISCUSSÃO.....	39
6	CONCLUSÕES.....	56
7	REFERÊNCIAS.....	57

Listas

LISTA DE ABREVIATURAS

AMP	monofosfato de adenosina
AMP-c	monofosfato cíclico de adenosina
ATP	trifosfato de adenosina
ANOVA	análise de variância
BE	excesso de base
BIC	bicarbonato
COX	ciclooxigenase
Dr. ^a	doutora
ECN	enterocolite necrotizante
<i>et al</i>	e outros
Hb	hemoglobina
HE	hematoxilia-eosina
HSP	<i>Heat shock proteine</i>
I/R	isquemia e reperfusão
I40	tempo final de isquemia
IL	interleucina
INF- γ	interferon-gama
LT	lesão total
MAPK	<i>mitogen-activeted protein kinase</i>
NAD ⁺	dinucleótido de nicotinamida-adenina
NO	óxido nítrico
PBS	solução tampão de fosfato
pCO ₂	pressão parcial de gás carbônico
pH	potencial hidrogeniônico
pO ₂	pressão parcial de oxigênio
Prof. ^a	professora

PTX	pentoxifilina
R40	tempo intermediário de reperfusão
R80	tempo final de reperfusão
RLO	radicais livres de oxigênio
SDMO	síndrome de disfunção de múltiplos órgãos
SH	solução salina hipertônica a 7,5%
sO ₂	saturação de oxigênio
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligant</i>
TNF-α	fator de necrose tumoral-alfa

LISTA DE SÍMBOLOS

%	por cento
°C	graus Celsius
µm	micrômetro
h	hora
mEq/kg	miliequivalente por quilograma
mEq/l	miliequivalente por litro
mg/dl	miligrama por decilitro
mg/kg	miligrama por quilograma
ml	mililitro
ml/kg	mililitro por quilograma
mmHg	milímetro de mercúrio
mmol/l	milimol por litro
mOsm/l	miliosmol por litro
U/kg	unidade internacional por quilograma
x	vezes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exposição (a) e clampeamento (b) dos vasos mesentéricos.....	11
Figura 2 - Distribuição dos animais nos grupos de estudo	12
Figura 3 - Representação esquemática dos tempos experimentais.....	13
Figura 4 - Resultado dos valores de sO ₂ (%): valores expressos em média e desvio padrão	23
Figura 5 - Resultado dos valores de lactato (mg/dl): valores expressos em média e desvio padrão	23
Figura 6 - Representação gráfica dos escores de lesão intestinal: valores expressos em média e desvio padrão	25
Figura 7 - Representação gráfica dos escores de lesão pulmonar: valores expressos em média e desvio padrão	25
Figura 8 - Graus de lesão intestinal nos diversos grupos de estudo, por amostragem.....	26
Figura 9 - Graus de lesão pulmonar nos diversos grupos de estudo, por amostragem	26
Figura 10 - Representação gráfica da média e do desvio-padrão da expressão citoplasmática de COX 2 encontrados na imunohistoquímica do intestino.....	29
Figura 11 - Graus de marcação citoplasmática de COX 2 no intestino nos diversos grupos de estudo, por amostragem.....	29

Figura 12 - Representação gráfica da média e do desvio-padrão da expressão citoplasmática de COX 2 encontrados na imuno-histoquímica do pulmão.....	30
Figura 13 - Graus de marcação citoplasmática de COX 2 no pulmão nos diversos grupos de estudo, por amostragem.....	30
Figura 14 - Representação gráfica da média e do desvio-padrão da expressão citoplasmática de caspase-3 clivada na imuno-histoquímica do intestino.....	33
Figura 15 Graus de marcação citoplasmática de caspase-3 clivada no intestino nos diversos grupos de estudo, por amostragem.....	33
Figura 16 - Representação gráfica da média e do desvio-padrão da expressão citoplasmática de caspase-3 clivada na imuno-histoquímica do pulmão.....	34
Figura 17 - Graus de marcação citoplasmática de caspase-3 clivada no pulmão nos diversos grupos de estudo, por amostragem.....	34
Figura 18 - Representação gráfica da média e do desvio-padrão da expressão citoplasmática de Bcl-2 na imuno-histoquímica do intestino	36
Figura 19 - Graus de marcação citoplasmática de Bcl-2 no intestino nos diversos grupos de estudo, por amostragem	36
Figura 20 - Representação gráfica da média e do desvio-padrão da expressão citoplasmática de Bcl-2 na imuno-histoquímica do pulmão	37
Figura 21 - Graus de marcação citoplasmática de Bcl-2 no pulmão nos diversos grupos de estudo, por amostragem	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação de Chiu.....	15
Quadro 2 - Sequência de procedimentos imuno-histoquímicos.....	18
Quadro 3 - Escala para estimativa de porcentagem de células imunoreativas pela expressão citoplasmática.....	19
Quadro 4 - Escala de estimativa de intensidade da coloração pela expressão citoplasmática.....	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Resultado dos valores de gasometria arterial.....	22
Tabela 2 - Comparação estatística entre os valores obtidos para lesão tecidual do intestino.....	24
Tabela 3 - Comparação estatística entre os valores obtidos para lesão tecidual do pulmão.....	24
Tabela 4 - Comparação estatística do ranqueamento para expressão citoplasmática de COX 2 na imuno-histoquímica do intestino.....	28
Tabela 5 - Comparação estatística do ranqueamento da expressão citoplasmática de COX 2 na imuno-histoquímica do pulmão.....	28
Tabela 6 - Comparação estatística do ranqueamento da expressão citoplasmática de caspase-3 clivada na imuno-histoquímica do intestino.....	32
Tabela 7 - Comparação estatística do ranqueamento da expressão citoplasmática de caspase-3 clivada na imuno-histoquímica do pulmão.....	32
Tabela 8 - Comparação estatística do ranqueamento da expressão citoplasmática de Bcl-2 na imuno-histoquímica do intestino.....	35
Tabela 9 - Comparação estatística do ranqueamento da expressão citoplasmática de Bcl-2 na imuno-histoquímica do pulmão.....	35

Resumo

Marques, GMN. Efeito da Pentoxifilina e da solução salina hipertônica na isquemia/reperfusão intestinal e suas consequências no pulmão: Estudo experimental em ratos.[tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2012. 70p

Isquemia e reperfusão (I/R) de vasos mesentéricos que acarretam insuficiência vascular aguda são acompanhadas de insuficiência em múltiplos órgãos e estão associados a altas morbidade e mortalidade. Os benefícios da solução hipertônica e da pentoxifilina foram testados isoladamente e em conjunto para melhorar o fluxo sanguíneo e o estado de oxigenação dos tecidos com redução da reação inflamatória e de apoptose, tanto no intestino quanto no pulmão enquanto órgão alvo. Foram utilizados 24 ratos Wistar machos pesando entre 200 e 250g distribuídos em 4 grupos (n=6). Foram submetidos à laparotomia e período de isquemia por clampeamento dos vasos mesentéricos por 40 minutos. O período de reperfusão foi de 80 minutos. A cada 40 minutos foram realizadas coletas de sangue arterial para gasometria. Os animais foram alocados nos grupos: grupo I/R (IR) onde I/R foi realizada e os animais receberam 4ml/kg de solução salina isotônica. O grupo solução salina hipertônica (SH) recebeu 4ml/kg de solução hipertônica a 7,5% e o grupo pentoxifilina (PTX) recebeu 30mg/kg de pentoxifilina diluída em NaCl 0,9% em um volume total de 4ml/kg ao final da isquemia intestinal. O grupo solução salina hipertônica+pentoxifilina (SH+PTX) recebeu ambas as soluções com volume total de 4ml/kg no mesmo momento. As biopsias de intestino e pulmão foram colhidas ao final do experimento e foram submetidas à coloração em HE e à imuno-histoquímica para COX 2, caspase-3 clivada e Bcl-2. Os valores de SO_2 revelaram diferença estatisticamente significativa aos 40 ($p=0,0099$) e 80 ($p=0,0074$) minutos de reperfusão na comparação do grupo IR com os grupos SH e SH+PTX. Os valores de lactato foram estatisticamente significantes aos 40 minutos ($p=0,0069$) e 80 minutos ($p=0,0098$) de reperfusão, entre os grupos IR e os grupos SH e SH+PTX. A avaliação histológica em HE no tecido intestinal evidenciou diferença estatisticamente significantes na comparação dos grupos SH ($p=0,0200$), PTX ($p=0,0200$) e SH+PTX ($p=0,0412$) com o grupo IR, assim como no tecido pulmonar, que evidenciou diferenças estatisticamente significantes na comparação de IR com SH ($p=0,006$), PTX ($p=0,0433$) e SH+PTX ($p=0,0040$). A marcação citoplasmática de COX 2 revelou diferença estatisticamente significativa ao comparar o grupo IR com o grupo SH+PTX ($p=0,0015$). Na avaliação do tecido pulmonar foi observado o grupo IR estabelecendo diferenças estatisticamente significantes na comparação com os grupos SH ($p=0,0455$), PTX ($p=0,0143$) e SH+PTX ($p=0,0455$). A avaliação de apoptose por imuno-histoquímica para caspase 3 clivada evidenciou diferença com significância estatística entre os grupos IR e SH ($p=0,0085$) e os grupos PTX e SH ($p=0,0120$) em tecido intestinal. Em tecido pulmonar, entre IR e PTX ($p=0,0090$) e SH e PTX ($p=0,0412$). A marcação citoplasmática de Bcl-2 evidenciou que somente entre os grupos IR e SH+PTX ($p=0,0012$) se estabeleceu significância estatística em tecido intestinal. No pulmão a diferença foi evidenciada em relação ao grupo IR e os grupos SH ($p=0,0128$), PTX ($p=0,0085$) e SH+PTX ($p=0,0066$). Conclui-se que o uso associado de pentoxifilina e solução salina hipertônica oferece os melhores resultados dos pontos de vista metabólico, inflamatório e da inibição da apoptose.

Descritores: 1. Reperfusão 2. Solução salina hipertônica 3. Pentoxifilina 4. Isquemia 5. Apoptose 6. Inflamação

Summary

Marques, GMN. The effect of pentoxifylline and hypertonic saline in intestinal ischemia / reperfusion and their consequences in the lung: an experimental study in rats.[thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2012. 70p

Ischemia-reperfusion (I/R) of the mesenteric vessels cause acute vascular insufficiency and is followed by multiple organs failure and high morbidity and mortality. The benefits of hypertonic saline (NaCl 7,5%) and pentoxifylline were tested to improve metabolic and oxygen status of tissues with reduced inflammatory reaction and apoptosis, both in the gut as in the lung as target organ. 24 male Wistar rats weighing 200 to 250g. They underwent laparotomy and ischemia by clamping the mesenteric vessels for 40 minutes. The reperfusion period was 80-minute long. Every 40 minutes, blood was collected for arterial gas analysis. The animals were set into 4 groups (n=6): I/R (IR) received isotonic saline just before reperfusion (4ml/kg). Hypertonic saline group (HS) received 7.5% hypertonic saline solution (4ml/kg) and Pentoxifylline group (PTX) received pentoxifylline (30mg/kg) diluted in NaCl 0.9% at the end of the mesenteric ischemia. Hypertonic saline+pentoxifylline group (SH-PTX) received both solutions at the same doses. Biopsies of intestine and lung were collected at the end of the experiment and were subjected to HE staining and immunohistochemistry staining to COX 2, cleaved caspase-3 and Bcl-2. About the values of sO_2 , a statistically significant difference was established when groups were compared at 40 (p=0.0099) minutes and 80 (p=0.0074) of reperfusion. The lactate values were statistically significant after 40 (p=0.0069) and 80 (p=0.098) minutes of reperfusion as well. Histological evaluation with HE revealed a statistically significant difference in the comparison of SH (p=0.0200), PTX (p=0.0200) and HS + PTX (p=0.0412) groups compared to IR group in intestine tissue and SH (p=0.0006), PTX (p=0.0433) and HS + PTX (p=0.040) in lung tissue. Cytoplasmic staining of COX 2 revealed a statistically significant difference when comparing IR (p=0.0015) to HS+PTX in intestinal tissue. The evaluation of the lung tissue for COX 2 showed IR group setting statistically significance when compared to HS (p=0,045), PTX (0.0143) and HS+PTX (p=0.0455) groups. The evaluation of apoptosis by immunohistochemistry for cleaved caspase 3 revealed that there was a significant difference between IR versus SH (p=0.0085) and PTX versus HS (p= 0.0120) in intestinal tissue and IR versus PTX (p=0,0090) and PTX versus SH (p=0.0412) in lung tissue. The cytoplasmic Bcl-2 expression shows that only between groups IR versus HS+PTX (p = 0.0012) statistical significance was established in intestinal tissue. Lung tissue showed the difference was evidenced in relation to IR versus SH (p=0.0128), PTX (p=0.0085) and HS+PTX (p=0.0066). It may be concluded that the combined use of pentoxifylline and hypertonic saline offers best results on metabolic, inflammatory and apoptosis inhibitory aspects.

Descriptors: 1. Reperfusion 2. Hypertonic saline 3. Pentoxifylline 4. Ischemia 5. Apoptosis 6. Inflammation

1. Introdução

1. Introdução

O fenômeno de isquemia e reperfusão (I/R) do território mesentérico que acarreta insuficiência vascular aguda está associado à insuficiência em múltiplos órgãos. Essa situação determina alta morbidade e alta mortalidade^(1, 2).

A síndrome de I/R intestinal é relevante em entidades onde o suprimento sanguíneo para o intestino é interrompido como em cirurgias vasculares abdominais e torácicas, retirada de enxertos intestinais, choque, hipoperfusão da insuficiência cardíaca, oclusões da artéria mesentérica, enterocolite necrotizante (ECN), sepse e trauma^(1, 3-8)

O choque circulatório causado por I/R no território mesentérico é devido especialmente ao aumento da permeabilidade vascular, ativação e aderência de polimorfonucleares (PMN), produção de substâncias próinflamatórias e formação de radicais livres de oxigênio (RLO) que se exteriorizam e desencadeiam hipotensão arterial, redução do fluxo mesentérico, do débito cardíaco e da temperatura corpórea^(1, 2, 9, 10).

Uma grave consequência da reperfusão tecidual é a lesão de órgãos não envolvidos no processo isquêmico primário^(5, 10, 11). A Síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (SDMO) é a principal causa de morte nos episódios de reperfusão intestinal. Uma das manifestações mais preocupantes da SDMO é a falência respiratória por lesão aguda de parênquima pulmonar^(8, 12).

As alterações teciduais de I/R se iniciam pelo bloqueio do fornecimento de oxigênio, impedindo o metabolismo aeróbio. Esse fato determina a depleção dos níveis de trifosfato de adenosina (ATP) e perturba a homeostase celular. Durante o período de isquemia, além do fornecimento

inadequado de oxigênio, com o comprometimento consequente da fosforilação oxidativa da mitocôndria, há um acúmulo de metabólitos que, diretamente ou por meio de mediadores, podem causar dano celular. Com a evolução da isquemia, a ação contínua e progressiva desses elementos na célula pode culminar em necrose. No entanto, quando o evento que dá início à isquemia é corrigido ou retirado antes que as alterações irreversíveis tenham tido tempo de ocorrer, o retorno do oxigênio permite o restabelecimento do metabolismo energético, a remoção de produtos tóxicos e retomada progressiva das funções celulares⁽⁵⁾.

A inflamação intestinal desencadeada por hipóxia e hipoperfusão acarreta lesão endotelial e liberação de mediadores inflamatórios que danificam a função da barreira intestinal. Uma vez que a barreira intestinal é danificada, há exposição da lâmina própria às endotoxinas e a outros produtos bacterianos. Como resultado da translocação bacteriana, exacerba-se o processo inflamatório e acentua-se a lesão epitelial intestinal⁽¹³⁻¹⁵⁾.

Por outro lado, a fisiopatologia de lesão pulmonar associada a I/R intestinal envolve uma série de mediadores inflamatórios e vasoativos. A formação de RLO resulta em dano a uma série de moléculas encontradas em tecidos como os ácidos nucleicos, lipídios, enzimas e receptores de membrana. Ácidos graxos poliinsaturados da membrana ligam-se rapidamente aos RLO em um processo que resulta na peroxidação desses lipídios. A peroxidação interrompe a compartimentalização celular que resulta em lise. A produção maciça de óxido nítrico (NO) tem sido implicada como fator citotóxico^(11, 16).

Os níveis de lactato sérico se correlacionam bem com a intensidade do estado de hipoperfusão mesentérica^(3, 17-20). Assim, a determinação laboratorial do lactato sérico, produto final do metabolismo anaeróbico, já foi demonstrada como um parâmetro confiável para avaliar a lesão causada por isquemia seguida de reperfusão^(3, 17). Quando ocorre a lesão celular, seja como resultado da falta de suprimento energético ou alteração da membrana

externa por substâncias liberadas no processo de I/R, o lactato aumenta na circulação^(17, 21).

Entender bem como o nível de lactato sérico pode ser útil na prática clínica requer conhecimento de como o lactato é produzido e metabolizado.

Em condições de oferta normal de recursos e de oxigênio aos tecidos, a energia celular é extraída por via aeróbia por meio do ciclo do ácido cítrico e de canais de eletrotransporte. Nessa situação as células convertem piruvato em acetil co-enzima A por meio da descarboxilação oxidativa. Quando surge a hipoperfusão tecidual a energia passa a ser criada por metabolismo anaeróbio. Nessa situação o piruvato é metabolizado em lactato gerando menor quantidade de ATP em contraposição à condição aeróbia. O restabelecimento da perfusão tecidual interrompe a produção excessiva de lactato que é rapidamente metabolizado no fígado assim que o fluxo hepático também é restabelecido⁽³⁾.

Hiperlactatemia é uma condição complexa que pode ocorrer por diversos mecanismos. A hiperlactatemia chamada tipo A é a que ocorre quando há uma queda na oxigenação tecidual que leva a um estado de metabolismo anaeróbio e uma produção excessiva de piruvato que posteriormente é convertido em lactato⁽²⁰⁾.

Já a hiperlactatemia tipo B depende de outros fatores não vinculados a hipóxia tecidual. Esses fatores são o equilíbrio entre produção e metabolização do lactato pelo fígado. Em condições de hipoperfusão esplâncnica grave o fluxo sanguíneo hepático se reduz e a capacidade hepática de utilizar o lactato encontra-se diminuída⁽²⁰⁾.

Uma das enzimas envolvidas no processo de I/R com ação local e em órgãos a distância é a ciclooxigenase (COX). A COX apresenta duas isoformas intituladas COX 1 e COX 2. A partir de descobertas que rotulavam a COX 1 como fisiologicamente constitutiva, agindo como citoprotetora gástrica e mantenedora da homeostase renal e plaquetária e COX 2 como a que surge apenas em situação de trauma tissular e inflamação, surgiu a

ideia que inibidores da COX 2 impediriam o processo inflamatório sem os efeitos colaterais indesejáveis, principalmente distúrbios gastrintestinais, advindos do bloqueio inespecífico da COX^(22, 23).

Na produção das prostaglandinas a partir do ácido araquidônico, a primeira enzima envolvida é a COX 2, que converte o ácido araquidônico em dois componentes instáveis: a prostaglandina G2 e a prostaglandina H2. Ela é expressa primariamente por células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos e monócitos. A COX 2 é induzida pelas citocinas (IL-1, IL-2 e fator de necrose tumoral) e outros mediadores nos sítios de inflamação (como fatores de crescimento e endotoxinas)^(24, 25).

Em condições normais, a molécula de oxigênio é submetida a uma redução tetravalente pelo citocromo na mitocôndria, criando água. No entanto, entre 1 a 2% dessas moléculas escapam desse caminho e sofrem uma reação univalente, gerando radicais livres de oxigênio. Esses radicais são neutralizados por enzimas antioxidantes endógenas, mas durante a reperfusão ocorre uma concentração grande de radicais livres, provocando um processo chamado de estresse oxidativo, com efeitos deletérios⁽⁵⁾.

Durante o estresse oxidativo, há aumento da permeabilidade dos poros de transição na membrana mitocondrial. Ocorre então, uma grande perda de dinucleótido de nicotinamida-adenina (NAD⁺) mitocondrial e maior quantidade de produção de radicais superóxidos acarreta a lesão celular. O resultado final é a ativação da cascata inflamatória levando à resposta pró-inflamatória exuberante caracterizada pela liberação de citocinas, prostanóides e NO^(16, 21).

A exposição ao peroxinitrito acarreta lesão celular que leva a morte celular por dois mecanismos: necrose e apoptose. O processo fisiológico da apoptose (morte celular programada) é crucial na renovação do epitélio. Ocorre nas células epiteliais das vilosidades intestinais e pode ser observada em fragmentos histológicos de pacientes submetidos à ressecção

intestinal por enterocolite necrotizante (ECN) ou outras condições de hipofluxo mesentérico⁽²⁶⁻²⁸⁾.

As características morfológicas da apoptose são: redução do tamanho celular, condensação da cromatina na periferia, formação de bolhas citoplasmáticas e corpos apoptóticos^(27, 29).

A apoptose é induzida por uma cascata de eventos moleculares que são iniciados por vários mecanismos e culminam na ativação das caspases^(26, 27, 30, 31).

Uma família de proteases, denominada caspase, desempenha um papel importante na apoptose. Estas enzimas estão presentes nas células sob a forma latente, e são ativadas durante o processo de apoptose. Podem ser classificadas como reguladoras (caspases 2, 7 e 8) ou como efetoras (caspases 3, 6 e 7)⁽³²⁾.

A mais conhecida delas é a caspase-3 e sua ativação determina que o evento que leva apoptose foi desencadeado^(11, 26-28, 30).

A apoptose é dividida em três fases: a indução inicial (dependente de transdução de sinal que uma determinada linhagem celular possui e de um estímulo indutivo), fase de comprometimento (dependente, pelo menos em parte, da translocação do citocromo c mitocondrial para o citoplasma) e a execução final (determinante da morte celular e é caracterizada por mudanças morfológicas independentes da sinalização inicial por via intrínseca ou extrínseca). Essa última fase está relacionada à degradação de proteínas celulares por membros da família das caspases⁽²⁸⁾.

Os danos causados pela I/R intestinal, com repercussão em órgão a distância, podem ser reduzidos pela estimulação de Bcl-2 que suprime a liberação do citocromo c^(12, 28).

Seguindo caminho contrário à I/R intestinal, Husain et al⁽³³⁾ (2003) estudaram a lesão intestinal em decorrência da instalação de um quadro de lesão pulmonar aguda em um modelo experimental que utiliza injeção de lipopolissacárideo na traqueia de ratos. Verificaram que houve menor grau

de lesão tecidual tanto no pulmão quanto no intestino dos animais transgênicos que apresentavam expressão exacerbada de Bcl-2.

A proteção dos tecidos submetidos a I/R, assim como os que sofrem a distância as consequências desse evento, tem sido investigadas amplamente. Alguns trabalhos experimentais demonstram benefícios na utilização da solução salina hipertônica (SH) na ressuscitação de animais submetidos a I/R do território esplâncnico⁽³⁴⁻³⁶⁾.

Ficou demonstrado que a solução salina hipertônica (NaCl 7,5%) apresenta efeitos benéficos nos estados de choque pela sua capacidade de expansão plasmática pois a maior quantidade de água vem das hemácias e das células endoteliais que perdem cerca de 8% de seu volume diretamente para o compartimento intravascular, melhorando o fluxo sanguíneo microcirculatório e sistêmico⁽¹⁰⁾.

A infusão de 4ml/kg de NaCl 7.5%, diluído no volume de plasma de um animal normovolêmico (40ml/kg) deveria representar um aumento plasmático de sódio de 128mEq/l acima do nível natrêmico basal (135-140mEq/l). Mas isso não foi observado em estudos experimentais e clínicos^(10, 37). A infusão de NaCl 7,5% (4ml/kg) eleva a natremia em 25mEq/l, que corresponde a um aumento de natremia de 5,12mEq/Kg no espaço extracelular. Pequenos volumes de solução hipertônica promovem expansão do volume sanguíneo, restauração do débito cardíaco e do fluxo regional esplâncnico, melhoram a microcirculação e modulam a resposta imune, dessa forma diminuindo a resposta inflamatória ao choque^(10, 37).

Os coeficientes de reflexão da barreira endotelial e da membrana celular ao sódio devem ser considerados na determinação da força osmótica gerada pelo gradiente estabelecido na utilização da solução salina hipertônica. O coeficiente de reflexão da barreira endotelial é igual a 0,1 enquanto o coeficiente de reflexão da membrana celular é igual a 1. Isso significa que um gradiente de 25mOsm/l exerce uma pressão osmótica de

500mmHg sobre a membrana celular e de apenas 50mmHg sobre a barreira endotelial⁽³⁷⁾.

Além da SH, tem-se utilizado o tratamento farmacológico para a redução dos efeitos de I/R. As drogas mais recentemente utilizadas para esse fim incluem a N-acetilcisteína, Dextran-70, pentoxifilina (PTX) e atenolol^(32, 38-44).

Pentoxifilina (derivado da metilxantina) apresenta um efeito antiinflamatório por meio da inibição da fosfodiesterase aumentando a concentração intracelular de monofosfato de adenosina cíclico (AMP-c)⁽⁴⁵⁾. Seu mecanismo de ação ainda não está completamente esclarecido. Várias teorias incluem não só o aumento de AMP-c intracelular mas como também sua interação com receptores de adenosina e a interação com o metabolismo de prostaglandinas^(45, 46).

Em publicação recente, Kreth et al⁽⁴⁶⁾ (2010) demonstraram um efeito sinérgico entre PTX e adenosina visto que, na presença de PTX, o aumento de AMP-c induzido pela adenosina não diminui pois o AMP-c não é hidrolizado em adenosina difosfato (ADP) e assim, uma quantidade suficiente de AMP-c passa a ficar disponível para iniciar as vias de proteção contra a inflamação.

PTX é um importante inibidor de TNF- α e tem se mostrado de grande valia em quadros infecciosos graves que evoluem com choque. Além da inibição da produção de TNF- α , a pentoxifilina também diminui a síntese de algumas interleucinas (IL-2, IL-6 IL-10) e interferon gama (INF- γ). A droga é capaz de aumentar a capacidade de deformação de neutrófilos e diminuir a degranulação, a aderência e a geração de RLO^(4, 20, 41, 42, 47).

A PTX é capaz de melhorar o fluxo sanguíneo pela liberação prostanóides vasodilatadores⁽⁴⁶⁾. Ela previne a vasoconstrição intestinal e mantém permeável a microcirculação em animais de laboratório em sepse. Também apresenta efeitos reológicos importantes como a prevenção do acúmulo de albumina em órgãos, a estabilização da pressão oncótica,

diminuição da frequência de diáteses hemorrágicas e diminuição da viscosidade do sangue^(32, 41, 42).

A utilização precoce da PTX em recém nascidos prematuros que desenvolveram ECN pode acarretar redução da progressão da doença e redução da área de necrose intestinal^(42, 47). Estudos mostram vantagem hemodinâmica na administração de PTX como a melhora do débito cardíaco, do fluxo sanguíneo mesentérico e da perfusão hepática^(40, 47, 48).

A tentativa de recuperação hemodinâmica associada à proteção da mucosa intestinal nos episódios após hipofluxo ou isquemia mesentérica não é efetiva quando realizada com as soluções isotônicas, mesmo que em grandes volumes, pois essas não são capazes de reverter as alterações reológicas sanguíneas, a perfusão capilar e as alterações microcirculatórias⁽⁴⁹⁾.

A associação dos benefícios da SH na redução do edema de endotélio e os benefícios reológicos da pentoxifilina demonstraram melhora no fluxo sanguíneo e no estado de oxigenação da mucosa do aparelho digestório e redução da aderência e migração de polimorfonucleares^(40, 43).

Tendo-se em vista os resultados obtidos por pesquisadores na associação de SH e PTX no fenômeno de I/R em território mesentérico, a proposta deste estudo é verificar se a SH e a PTX melhoram a repercussão metabólica e tecidual da lesão causada por I/R.

2. Objetivos

2. Objetivos:

2.1. Geral:

Estudar o fenômeno de isquemia e reperfusão intestinal a sua repercussão no pulmão após o uso de pentoxifilina e solução salina hipertônica a 7,5%.

2.2. Específicos:

Estudar os aspectos metabólicos, histológicos, imuno-histoquímicos inflamatórios e de apoptose em intestino e pulmão de ratos submetidos à isquemia e reperfusão de intestino, sob a ação de pentoxifilina e solução salina hipertônica a 7,5%.

3. Métodos

3. Métodos

3.1. Modelo animal

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob n.º 120/10, em 18 de agosto de 2010. Todos os animais foram manipulados segundo os princípios do National Institute of Health (1985) e The American Physiological Society (1995) para o cuidado, manipulação e utilização de animais de laboratório.

Foram utilizados 24 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) machos pesando entre 200 e 250g, com aproximadamente três meses de idade, mantidos em gaiola apropriada com livre acesso à água e em jejum de alimentos por 12 horas.

A indução anestésica foi realizada com injeção intraperitoneal de cetamina (50mg/kg) associada à xilazina (10mg/kg) na mesma seringa.

Após ser fixado com fita adesiva em mesa cirúrgica aquecida (Insight®) para manutenção da temperatura corpórea, o animal foi submetido à tricotomia do abdome. Uma incisão crural a direita foi realizada para dissecação dos vasos femorais. A artéria femoral dissecada recebeu um cateter heparinizado (Cateter percutâneo 24-gauge) para coleta de sangue para gasometria arterial e infusão de soluções.

Por meio de uma laparotomia mediana, as alças de intestino delgado foram expostas e envoltas em compressa úmida com solução fisiológica. Realizou-se a exposição dos vasos mesentéricos anteriores ou craniais. Nesse momento, os animais receberam uma injeção intravenosa de heparina (100U/kg).

Figura 1 -: Exposição (a) e clampeamento (b) dos vasos mesentéricos

Os animais foram distribuídos em quatro grupos de 06 animais cada, conforme figura 2:

Figura 2 - Distribuição dos animais nos grupos de estudo

Os animais de **grupo I/R (IR)**, foram submetidos à laparotomia e isquemia mesentérica por meio de clampeamento dos vasos mesentéricos (Figura 1) por 40 minutos. O íleo terminal assim como o jejuno (logo após o ângulo de Treitz), juntamente com seus respectivos pedículos vasculares, foram ocluídos por meio de ligadura simples com fio de algodão 4-0 de forma a não permitir refluxo de sangue colateral para o intestino delgado. O clampe foi removido após os 40 minutos de isquemia e o animal ficou em observação durante os 80 minutos de reperfusão intestinal.

Ao final do período de isquemia, imediatamente antes da retirada do clampe dos vasos mesentéricos, os animais do grupo IR receberam solução de NaCl a 0,9% na dosagem de 4ml/kg.

A coleta de amostras de sangue para gasometria arterial foi feita nos tempos I40 (ao fim do período de isquemia e antes da retirada do clampe dos vasos mesentéricos), R40 (tempo intermediário do período de reperfusão) e R80 (ao final do período de reperfusão) (figura 3).

Figura 3 - Representação esquemática dos tempos experimentais

Os animais dos grupos de estudo foram submetidos à laparotomia, à isquemia mesentérica e reperusão e às coletas de amostras de sangue da mesma maneira que o Grupo IR, porém, imediatamente antes do início da reperusão (I40), cada grupo recebeu o tratamento apropriado. Os animais do **grupo SH** receberam uma dose de 4ml/kg de NaCl 7,5%, os do **grupo PTX** receberam uma dose de 30mg/kg de pentoxifilina diluídos em NaCl 0,9% perfazendo volume total de 4ml/kg e os do **grupo SH+PTX** receberam uma dose de 30mg/kg de pentoxifilina diluídos em 4ml/kg de solução salina hipertônica.

Ao final do estudo os animais foram submetidos à eutanásia por injeção letal de KCl 19,1%. Nesse momento foram colhidas as amostras do íleo terminal e do pulmão direito de todos os animais para histologia e imuno-histoquímica.

3.2. Histologia

As amostras teciduais, logo após a coleta, foram colocadas em solução tamponada de formol a 10% por 24h e depois armazenadas em solução de álcool a 70° GL até o processamento.

As amostras de intestino delgado, incluídas em parafina, cortadas em micrótomo com espessura de 4µm, coradas por hematoxilina e eosina (HE) e examinadas sob microscopia ótica foram classificadas segundo o escore de Chiu⁽⁵⁰⁾ para lesão de mucosa (Quadro 1).

No pulmão foi analisada a ocorrência de infiltração leucocitária (presença de leucócitos nas varias partes do pulmão), congestão vascular (presença de vasos dilatados no estroma pulmonar) e espessamento dos septos alveolares (aumento na espessura dos septos).

Um sistema de escore para graduar as lesões presentes no pulmão, baseado na presença e intensidade das alterações foi utilizado. Foram observados 10 campos ao acaso, de cada animal (100 e 200 x). As lesões foram graduadas em cruces variando de ausente (0) até quatro (++++), dependendo da sua intensidade⁽⁵¹⁾. Estes valores foram transformados em números para aplicação de testes estatísticos, da seguinte maneira: ausência = 0; + = 1; ++ = 2; +++ = 3 e, ++++ = 4.

Quadro 1 - Classificação de Chiu⁽⁵⁰⁾

Grau	Alteração Histológica
0	Mucosa sem alteração
1	Vilosidades bem constituídas, sem lise celular ou processo inflamatório, porém com formação de espaço subepiteliais (Espaço de Grünhagen)
2	Presença de lise celular, formação de espaços de Grünhagen e espaçamento aumentado entre vilosidades
3	Destruição da parte livre das vilosidades, presença de capilares dilatados e de células inflamatórias
4	Destruição estrutural das vilosidades, havendo apenas esboço de algumas, formadas por células inflamatórias e material necrótico, com hemorragia e ulceração glandular basal
5	Destruição de toda a túnica mucosa, não mais sendo observada qualquer estrutura glandular, mas apenas material amorfo depositado sobre a submucosa

3.3. Imuno-histoquímica

3.3.1. Expressão citoplasmática de ciclooxigenase-2 (COX 2)

Para se determinar a expressão da COX 2 empregou-se o material previamente parafinado. Foram realizadas nele secções de 4µm, sendo os cortes então processados. Foi utilizado anticorpo primário para COX 2 (Cox-2^(m-19), sc-1747, Santa Cruz, Lote: G2205, Monoclonal goat) na diluição de 1:100 e a sequência de procedimentos para obtenção das lâminas da imuno-histoquímica estão descritas no Quadro 2.

3.3.2. Expressão citoplasmática de caspase-3 clivada

Para o estudo da apoptose celular quantificou-se a expressão da caspase-3 clivada, utilizando material previamente parafinado, realizando secções de 4µm de espessura, sendo então estes cortes processados para a realização da análise. A sequência de procedimentos para obtenção das lâminas da imuno-histoquímica também foi semelhante a descrita no Quadro 2 com a utilização de anticorpo primário caspase-3 clivada (AP-1027 Anti cleaved caspase 3^(Asp 175), Calbiochem, Lote: D29363, Rabbit pAb) (diluição de 1:100).

3.3.4. Expressão citoplasmática de Bcl-2

Para se determinar a expressão de Bcl-2 empregou-se o material previamente parafinado. Foram realizadas nele secções de 4µm, sendo os

cortes então processados. A sequência de procedimentos para obtenção das lâminas da imuno-histoquímica foi feita à semelhança da mostrada no Quadro 2 utilizando-se o anticorpo primário Bcl-2 (Bcl-2^(C-2), sc-7382, Santa Cruz, Lote: J0203, Monoclonal mouse)(diluição de 1:100).

3.3.5. Avaliação da expressão dos imunomarcadores: COX 2, caspase-3 clivada, Bcl-2

Para a avaliação da expressão dos imunomarcadores citoplasmáticos de inflamação e de apoptose foi usado o método de pontuação imuno-histoquímica⁽⁵²⁾, calculado pela combinação de uma estimativa da porcentagem de células imunorreativas (semiquantitativo), com uma estimativa da intensidade da coloração (qualitativo) como seguem os Quadros 3 e 4. Os escores das lâminas foram determinados pela multiplicação dos escores semiquantitativos de porcentagem de células e de intensidade de coloração. Os resultados obtidos foram posteriormente ranqueados em quatro postos para aplicação dos testes estatísticos.

Quadro 2 - Sequência de procedimentos imuno-histoquímicos

Passo	Procedimento
1	Fixação das lâminas em estufa a 60°C durante a noite
2	Desparafinação em xilol
3	Reidratação em soluções graduadas de etanol
4	Recuperação antigênica em calor úmido com ácido cítrico (pH=6) por 60 minutos
5	Pré-incubação em solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% em tampão fosfato (PBS) por 5 minutos para inativação da peroxidase endógena
6	Incubação em anticorpo primário.
7	Incubação em anticorpo secundário: Sistema Polímero detecção
8	Revelação imuno-histoquímica para esse marcador com Diaminobenzidina
9	Contra coloração com Hematoxilina
10	As lâminas receberam resina e lamínula em sua montagem e foram etiquetadas para a identificação

Quadro 3 - Escala para estimativa de porcentagem de células imunorreativas pela expressão citoplasmática (semiquantitativa)

GRAU	PORCENTAGEM DE CÉLULAS POSITIVAS
0	Células não coradas
1	1-10% de células coradas
2	11-50% de células coradas
3	51-80% de células coradas
4	81-100% de células coradas

Quadro 4 - Escala de estimativa de intensidade da coloração pela expressão citoplasmática (qualitativa)

GRAU	INTENSIDADE DA COLORAÇÃO
0	Negativo
1	Fraco
2	Moderado
3	Forte

3.4. Análise estatística

Na comparação entre os grupos de estudo, foi utilizada a técnica de Análise de Variância (ANOVA) para amostras independentes – análise de uma variável. As diferenças foram localizadas pelo pós teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

Aplicou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para amostras independentes na análise de ocorrência de lesão tecidual, inflamação e apoptose. As diferenças foram estabelecidas pelo pós teste de Student-Newman-Keuls

Adotou-se o nível de significância de 0,05 ($\alpha \leq 5\%$) para rejeição da hipótese de nulidade, e níveis descritivos (p) iguais ou inferiores a esse valor foram considerados significantes.

4. Resultados

4. Resultados

4.1. Avaliação funcional:

Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes nos valores de sO_2 e de lactato após 40 minutos e 80 minutos de reperfusão na análise desses parâmetros entre grupos (Tabela 1).

Em relação aos valores de sO_2 , no tempo R40 foram evidenciadas diferenças estatisticamente significantes do grupo IR em relação ao grupo tratado com solução salina hipertônica (SH) e ao grupo no qual se associou o tratamento com solução salina hipertônica e com pentoxifilina (SH+PTX). Em relação ao grupo tratado somente com pentoxifilina (PTX), este não diferiu estatisticamente do grupo IR. Esse mesmo padrão de diferenças se manteve até o tempo R80 (Figura 5).

Na avaliação das dosagens de lactato foram observadas diferenças estatisticamente significantes após 40 minutos de reperfusão, entre o grupo IR e os grupos SH, PTX e SH+PTX. Essa diferença demonstra a proteção oferecida pelos tratamentos dos grupos com a manutenção dos valores de lactato em níveis próximos ao normal. Entre os grupos que receberam tratamento não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes (Figura 6).

Após 80 minutos de reperfusão (R80), na avaliação dos valores de lactato, as diferenças estatisticamente significantes ocorreram entre os grupos IR e os grupos tratados com SH, associado ou não à PTX. Não se observou diferença estatisticamente significativa entre o grupo IR e o grupo PTX aos 80 minutos de reperfusão. Na comparação dos resultados do grupo SH e PTX encontrou-se diferença estatisticamente significativa. Após 80 minutos de reperfusão, somente a solução salina hipertônica, seja associada à PTX ou não, foi capaz de manter os níveis de lactato próximos ao normal (Figura 6).

Tabela 1 - Resultado dos valores de gasometria arterial (média e desvio padrão)

Tempo	Variáveis	IR	SH	PTX	SH+PTX	p
I40	pH	7,26±0,02	7,25±0,04	7,23±0,05	7,28±0,08	0,3594
	pCO ₂ (mmHg)	50,07±8,58	49,75±5,08	49,37±4,47	45,63±10,85	0,7352
	pO ₂ (mmHg)	208,52±87,67	309,83±129,37	246,67±54,09	276,83±58,61	0,5705
	Hb(mg/dl)	12,53±0,82	13,17±1,59	12,78±0,86	13,63±0,63	0,3093
	sO ₂ (%)	96,58±1,07	97,36±1,21	97,26±1,04	97,40±0,25	0,1887
	Lactato(mg/dl)	6,83±2,14	5,33±1,75	4,33±1,03	6,16±1,17	0,1370
	BE(mmol/l)	(4,2)±2,74	(5,08)±2,34	(5,81)±1,84	(4,98)±2,85	0,7382
	HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	20,25±1,79	19,53±1,66	18,90±1,53	19,85±2,10	0,6176
R40	pH	7,16±0,06	7,22±0,04	7,27±0,12	7,22±0,09	0,1910
	pCO ₂ (mmHg)	50,40±7,64	46,78±8,94	41,43±8,48	43,83±7,34	0,2827
	pO ₂ (mmHg)	180,83±81,66	318,17±125,28	213,83±23,68	228,33±52,84	0,1617
	Hb(mg/dl)	13,48±1,73	13,27±0,43	12,85±1,01	13,40±0,87	0,8244
	sO ₂ (%)	94,75±3,66	98,68±1,02	97,22±0,95	98,92±1,26	0,0099
	Lactato(mg/dl)	25,67±9,93	7,33±2,42	12,50±6,47	9,83±3,66	0,0069
	BE(mmol/l)	(10,83)±1,39	(8,28)±1,73	(8,62)±4,04	(9,30)±2,88	0,3961
	HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	15,07±0,79	17,13±0,99	17,27±3,09	16,57±2,41	0,1577
R80	pH	7,06±0,05	7,19±0,07	7,17±0,11	7,14±0,09	0,0759
	pCO ₂ (mmHg)	52,38±6,43	48,87±14,09	36,33±10,36	46,98±10,87	0,0913
	pO ₂ (mmHg)	159,83±32,55	300,50±104,49	237,50±51,21	259,83±90,02	0,3294
	Hb(mg/dl)	13,10±1,75	13,82±0,74	12,53±0,58	14,03±0,89	0,0987
	sO ₂ (%)	95,80±2,11	98,68±1,02	96,67±0,60	98,18±1,46	0,0074
	Lactato(mg/dl)	34,33±18,84	10,17±3,43	29,83±19,34	14,00±7,35	0,0098
	BE(mmol/l)	(13,40)±3,12	(9,23)±1,71	(12,35)±6,11	(11,75)±4,76	0,3998
	HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	13,08±2,03	16,36±1,05	14,52±4,17	14,60±3,32	0,2976

Figura 4 - Resultado dos valores de sO₂ (%): valores expressos em média e desvio padrão (* $p < 0,05$ na comparação com IR)

Figura 5 - Resultado dos valores de lactato (mg/dl): valores expressos em média e desvio padrão (* $p < 0,05$ na comparação com IR e [¥] $p < 0,05$ na comparação com SH)

4.2. Avaliação histológica em HE

Conforme pode ser observado nas Tabelas 2 e 3, na análise dos escores das biópsias de intestino e de pulmão coradas em HE, foram encontrados resultados semelhantes. Assim, existiram diferenças estatisticamente significantes na comparação do grupo IR e os demais grupos. O grau de lesão tecidual foi menor nos grupos tratados (Figuras 6 a 9).

Tabela 2 - Comparação estatística entre os valores obtidos para lesão tecidual do intestino (Student-Newman-Keuls)

Comparação entre Grupos	Valores de <i>p</i>
IR e SH	0,0200
IR e PTX	0,0200
IR e SH+PTX	0,0412
SH e PTX	1,0000
SH e SH+PTX	0,7751
PTX e SH+PTX	0,7751

Tabela 3 - Comparação estatística entre os valores obtidos para lesão tecidual do pulmão (Student-Newman-Keuls)

Comparação entre Grupos	Valores de <i>p</i>
IR e SH	0,0006
IR e PTX	0,0433
IR e SH+PTX	0,0040
SH e PTX	0,1590
SH e SH+PTX	0,5815
PTX e SH+PTX	0,3913

Figura 6 - Representação gráfica dos escores de lesão intestinal: valores expressos em média e desvio padrão (* $p < 0,05$ na comparação com IR)

Figura 7 - Representação gráfica dos escores de lesão pulmonar: valores expressos em média e desvio padrão (* $p < 0,05$ na comparação com IR)

Figura 8 - Graus de lesão intestinal nos diversos grupos de estudo, por amostragem: (a) grau 1, (b) grau 2, (c) grau 3 e (d) grau 4

Figura 9 - Graus de lesão pulmonar nos diversos grupos de estudo, por amostragem: (a) e (b) grau 1, (c) grau 2 e (d) grau 3

4.3. Avaliação imuno-histoquímica

4.3.1. Avaliação da atividade de COX 2

Os cortes de intestino delgado submetidos a estudo imuno-histoquímico para COX 2 mostraram que somente o grupo SH+PTX apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo IR, com menor intensidade e menor grau de marcação citoplasmática. A utilização de SH e PTX de forma isolada não ofereceu proteção suficiente para relevância estatística entre esses grupos e o grupo IR, conforme Tabela 4 e Figuras 10 e 11.

Na avaliação dos cortes pulmonares observou-se que no grupo IR houve forte marcação citoplasmática com grande número de células marcadas para COX 2. O processo de isquemia e reperfusão que ocorreu em território mesentérico contribuiu para reação inflamatória intensa no pulmão. Na comparação dos grupos, encontrou-se significância estatística nas diferenças entre IR e todos os demais grupos, conforme Tabela 5 e Figuras 12 e 13.

Tabela 4 - Comparação estatística do ranqueamento para expressão citoplasmática de COX 2 na imuno-histoquímica do intestino (Student-Newman-Keuls)

Comparação entre Grupos	Valores de <i>p</i>
IR e SH	0,0758
IR e PTX	0,1590
IR e SH+PTX	0,0015
SH e PTX	0,7133
SH e SH+PTX	0,1590
PTX e SH+PTX	0,0758

Tabela 5 - Comparação estatística do ranqueamento da expressão citoplasmática de COX 2 na imuno-histoquímica do pulmão (Student-Newman-Keuls)

Comparação entre Grupos	Valores de <i>p</i>
IR e SH	0,0455
IR e PTX	0,0143
IR e SH+PTX	0,0455
SH e PTX	0,6534
SH e SH+PTX	1,0000
PTX e SH+PTX	0,6534

Figura 10 - Representação gráfica da média e do desvio-padrão da expressão citoplasmática de COX 2 encontrados na imuno-histoquímica do intestino (* $p < 0,05$ em relação a SH+PTX)

Figura 11 - Graus de marcação citoplasmática de COX 2 no intestino nos diversos grupos de estudo, por amostragem: (a) grau 0, (b) grau 1, (c) grau 2 e (d) grau 3

Figura 12 - Representação gráfica da média e do desvio-padrão da expressão citoplasmática de COX 2 encontrados na imuno-histoquímica do pulmão (* $p < 0,05$ em relação a IR)

Figura 13 - Graus de marcação citoplasmática de COX 2 no pulmão nos diversos grupos de estudo, por amostragem: (a) grau 0, (b) grau 1, (c) grau 2 e (d) grau 3

4.3.2. Avaliação de apoptose

4.3.2.1. Avaliação da atividade de caspase-3 clivada

Conforme pode ser observado na Tabela 6 e nas Figuras 14 e 15, a avaliação da atividade de caspase-3 clivada nas lâminas de intestino mostrou que as diferenças estatisticamente significantes ocorreram na comparação dos grupos IR e PTX em relação ao grupo SH. Foi constatada uma menor expressão citoplasmática de caspase-3 clivada quando a solução salina hipertônica foi utilizada como tratamento. Apesar do grupo SH+PTX também haver apresentado expressão citoplasmática mais atenuada de caspase-3 clivada, este não configurou diferença estatisticamente significante em relação aos outros grupos.

Nos cortes de pulmão ficaram evidenciadas diferenças com significância estatística entre os grupos tratados com PTX e os grupos IR e SH. No tecido pulmonar a utilização de pentoxifilina, de maneira diversa ao observado no intestino, propiciou a diminuição da expressão citoplasmática de caspase-3 clivada de maneira significativa. Apesar do grupo SH+PTX ter apresentado menor expressão citoplasmática de caspase-3 clivada, não foi observada diferença estatisticamente significante entre este e os demais. A Tabela 7 e as Figuras 16 e 17 ilustram os resultados.

Tabela 6 - Comparação estatística do ranqueamento da expressão citoplasmática de caspase-3 clivada na imuno-histoquímica do intestino (Student-Newman-Keuls)

Comparação entre Grupos	Valores de <i>p</i>
IR e SH	0,0085
IR e PTX	0,9025
IR e SH+PTX	0,0982
SH e PTX	0,0120
SH e SH+PTX	0,3272
PTX e SH+PTX	0,1258

Tabela 7 - Comparação estatística do ranqueamento da expressão citoplasmática de caspase-3 clivada na imuno-histoquímica do pulmão (Student-Newman-Keuls)

Comparação entre Grupos	Valores de <i>p</i>
IR e SH	0,5676
IR e PTX	0,0090
IR e SH+PTX	0,0604
SH e PTX	0,0412
SH e SH+PTX	0,1914
PTX e SH+PTX	0,4624

Figura 14 - Representação gráfica da média e do desvio-padrão da expressão citoplasmática de caspase-3 clivada na imuno-histoquímica do intestino (* $p < 0,05$ em relação a SH)

Figura 15 – Graus de marcação citoplasmática de caspase-3 clivada no intestino nos diversos grupos de estudo, por amostragem: (a) grau 1, (b) grau 2, (c) grau 3 e (d) grau 4

Figura 16 - Representação gráfica da média e do desvio-padrão da expressão citoplasmática de caspase-3 clivada na imuno-histoquímica do pulmão (* $p < 0,05$ em relação a PTX)

Figura 17 – Graus de marcação citoplasmática de caspase-3 clivada no pulmão nos diversos grupos de estudo, por amostragem: (a) grau 2, (b) grau 2, (c) grau 3 e (d) grau 4

4.3.2.2. Avaliação de atividade de Bcl-2

A marcação citoplasmática de Bcl-2 no intestino revelou diferença estatisticamente significativa somente entre os grupos IR e SH+PTX. A comparação feita entre os demais grupos não mostrou diferença estatisticamente significativa como ilustram a Tabela 8 e as Figuras 18 e 19.

Tabela 8 - Comparação estatística do ranqueamento da expressão citoplasmática de Bcl-2 na imuno-histoquímica do intestino (Student-Newman-Keuls)

Comparação entre Grupos	Valores de <i>p</i>
IR e SH	0,1846
IR e PTX	0,0724
IR e SH+PTX	0,0012
SH e PTX	0,6387
SH e SH+PTX	0,0550
PTX e SH+PTX	0,1473

Tabela 9 - Comparação estatística do ranqueamento da expressão citoplasmática de Bcl-2 na imuno-histoquímica do pulmão (Student-Newman-Keuls)

Comparação entre Grupos	Valores de <i>p</i>
IR e SH	0,0128
IR e PTX	0,0085
IR e SH+PTX	0,0066
SH e PTX	0,8864
SH e SH+PTX	0,8223
PTX e SH+PTX	0,9249

Figura 18 - Representação gráfica da média e do desvio-padrão da expressão citoplasmática de Bcl-2 na imuno-histoquímica do intestino ($p < 0,05$ em relação a SH+PTX)

Figura 19 – Graus de marcação citoplasmática de Bcl-2 no intestino nos diversos grupos de estudo, por amostragem: (a) grau 1, (b) grau 2, (c) grau 3 e (d) grau 4

Figura 20 - Representação gráfica da média e do desvio-padrão da expressão citoplasmática de Bcl-2 na imuno-histoquímica do pulmão ($p < 0,05$ em relação aos grupos SH, PTX e SH+PTX)

Figura 21 - Graus de marcação citoplasmática de Bcl-2 no pulmão nos diversos grupos de estudo, por amostragem: (a) grau 4, (b) grau 3, (c) grau 2 e (d) grau 1

Conforme a Tabelas 9 e as Figuras 21 e 22, todos os três grupos tratados (SH, PTX e SH+PTX) exibiram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo IR quando se comparou a expressão citoplasmática de Bcl-2 no pulmão. Entre os grupos tratados não se evidenciou a mesma diferença.

5. Discussão

5. Discussão

Existem vários modelos que foram descritos para o estudo de isquemia e reperfusão intestinal. Os animais de experimentação mais utilizados tem sido o rato, pois a sua circulação esplâncnica apresenta semelhanças com a do ser humano. Tal fato permitiria alguma extrapolação das informações obtidas de uma espécie para outra^(1, 5).

Ao se comparar os tipos de oclusão vascular, seja da artéria mesentérica, da veia mesentérica e a oclusão de ambos os vasos mesentéricos, alguns autores relatam uma maior mortalidade dos ratos na oclusão exclusivamente arterial. Por outro lado, maior grau de lesão de mucosa intestinal na oclusão venosa de maneira isolada quando comparada à oclusão arterial. Encontram-se resultados semelhantes de lesão, local ou a distância, na oclusão de ambos os vasos mesentéricos^(2, 53).

A oclusão arterial resulta de trombose ou embolia ou, mais frequentemente, por eventos não oclusivos como quando há um baixo fluxo sanguíneo para o território esplâncnico em consequência a insuficiência cardíaca, aneurisma de aorta, sepse ou outros estados de choque circulatório⁽⁵⁾.

Apesar de menos frequente, a oclusão venosa pode causar infarto hemorrágico intestinal com isquemia mesentérica aguda e lesões teciduais irreversíveis^(5, 53, 54).

Outros estudos confirmam essa afirmativa e demonstram que a lesão intestinal devida a oclusão venosa ou arteriovenosa ocorre em menos de cinco minutos de isquemia enquanto que a oclusão unicamente arterial leva mais tempo para apresentar o mesmo grau de lesão^(2, 55, 56).

A oclusão tanto da artéria quanto da veia mesentérica, ou de ambas, pode acarretar lesão significativa no intestino e em outros órgãos à distância e pode evoluir para a síndrome de disfunção de múltiplos órgãos (SDMO)^(5, 56, 57).

O ATP e o pH dos tecidos intestinais diminuem quase que imediatamente após a oclusão da artéria mesentérica enquanto que na oclusão venosa a diminuição é mais lenta e gradativa sugerindo que ainda há algum grau de perfusão minimamente mantida para os tecidos⁽⁵⁶⁾.

O fluxo colateral entre os próprios vasos sanguíneos mesentéricos ou com a circulação adjacente é numeroso e pode compensar a redução de fluxo de sangue para os tecidos em decorrência da oclusão dos vasos mesentéricos^(12, 58, 59).

A técnica escolhida foi o clampeamento de artéria e veia mesentéricas juntamente com a ligadura do jejuno logo abaixo do ângulo de Treitz e do íleo terminal, juntamente com seus respectivos pedículos vasculares durante o tempo de isquemia de modo que a circulação colateral não interviesse no processo de I/R ora estudado, conforme do estudo de Guzman-de la Garza *et al*⁽²⁾ (2009).

O tempo de isquemia mesentérica suficiente para a obtenção de lesão intestinal e de órgãos a distância, culminando em choque, varia na literatura desde pequenos intervalos de cinco minutos até tempos de isquemia superiores a 60 minutos^(1, 53, 56, 57).

Foi determinado um tempo de isquemia de 40 minutos pois autores como Montero⁽³⁸⁾ (2003) e Vincenti⁽⁵³⁾ (2010), entre outros, já demonstraram que 40 minutos de isquemia são suficientes para provocar alterações metabólicas e teciduais na oclusão dos vasos mesentéricos^(57, 60, 61).

Diversas substâncias têm sido usadas para tentar diminuir o grau de lesão tecidual causada pelo processo de isquemia e reperfusão intestinal. Com mecanismos de ação diferentes, buscam eliminar ou diminuir a

produção de radicais livres de oxigênio, atenuar ou bloquear a produção de interleucinas, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), fator de agregação plaquetária e moléculas de adesão^(5, 32, 38-43, 62).

Desde os trabalhos de Rocha e Silva *et al*^(63, 64) em 1980, a utilização de SH na ressuscitação de animais submetidos a um estado de choque mostrou mais vantagens quando comparada à utilização de solução salina isotônica (NaCl 0,9%).

Do ponto de vista hemodinâmico, os efeitos benéficos após a ressuscitação com solução salina hipertônica a 7,5% estão relacionados à potente capacidade de expansão plasmática dessa solução. Os fluidos saem do compartimento intracelular para melhorar o fluxo sanguíneo sistêmico e microcirculatório^(40, 63).

No nível sistêmico, os benefícios hemodinâmicos são devidos ao poder de expansão plasmática da SH quando 1ml de NaCl 7,5% é capaz de aumentar o volume plasmático em 2,75ml^(10, 37, 64).

As principais fontes de expansão do plasma após a infusão de SH são as células endoteliais e os eritrócitos que poderiam perder aproximadamente 8% de seu volume para o espaço intravascular. Essa transição de volume resultaria em efeitos hemodinâmicos importantes para a microcirculação uma vez que o edema de hemácias e do endotélio são fatores determinantes para a viscosidade e para a resistência hidráulica da microcirculação^(10, 37, 63).

A expansão intravascular causada pela solução salina hipertônica ocorre a partir do compartimento intracelular e não do intersticial. A passagem de fluidos do espaço intracelular para o intravascular deve ser considerado benéfico uma vez que nos estados de choque, isquemia/reperfusão, circulação extracorpórea e sepse, entre outras, há edema celular devido a ativação da cascata inflamatória e da disfunção da bomba sódio/potássio na membrana celular^(10, 37).

Em 2006, Poli de Figueiredo *et al*⁽¹⁰⁾ ressaltaram a importância dos resultados produzidos pelo uso de SH no choque séptico em níveis sistêmico e microcirculatório ressaltando o efeito inotrópico positivo sobre o miocárdio, a restauração de função renal e os efeitos imunomodulatórios e anti-inflamatórios.

Yada-Langui *et al*⁽⁴³⁾, em 2004, mostraram as vantagens da associação da pentoxifilina à solução hipertônica a 7,5% no choque hemorrágico. Apesar de não demonstrarem vantagens hemodinâmicas ou metabólicas sobre o tratamento do choque com solução de ringer lactato na primeira hora da tratamento, a utilização de menores volumes (4ml/kg de NaCl 7,5%) pode oferecer um ganho considerável de tempo na terapêutica em relação ao uso da solução de ringer lactato (100ml/kg), principalmente quando considera-se a infusão em uma condição pré-hospitalar.

Na lesão de I/R intestinal observou-se que a pentoxifilina induz a redução dos níveis teciduais de malondialdeído, produto final da peroxidação de lipídios, e elevação de glutadiona, agente antioxidante⁽³²⁾.

A pentoxifilina, aplicada em recém nascidos em sepse, melhora a taxa de sobrevivência, reduzindo a acidose metabólica, o lactato sérico e a insuficiência renal e hepática^(47, 48). Ao manter a função celular endotelial durante a sepse e reduzir a concentração plasmática das citocinas, a pentoxifilina também diminui os sinais clínicos de ECN^(41, 42, 65).

A SH apresenta o efeito reológico de aumentar a deformabilidade das células vermelhas ao reduzir o edema celular. De maneira indireta, pelo aumento do volume intravascular ao transferir volume das hemácias e do endotélio edemaciados, diminui a força de cisalhamento do sangue ao reduzir sua viscosidade como afirmou Zhao *et al*⁽⁶⁶⁾ ao estudar a recuperação de perda das características hemorreológicas causada pelo choque hipovolêmico em um modelo experimental em 2009.

A deformabilidade das hemácias é influenciada pela morfologia celular, deformabilidade de membrana, pela viscosidade do líquido intracelular e pela quantidade de energia que existe na célula (ATP)⁽⁶⁷⁾.

A habilidade que as hemácias tem em se deformar é essencial para o fluxo sanguíneo em capilares. A perda dessa capacidade de deformação reduz o tempo médio de vida das hemácias^(68, 69).

A recuperação das propriedades hemorreológicas (aumento da capacidade de deformação das hemácias e diminuição da viscosidade sanguínea) restauram o fluxo sanguíneo mais rapidamente melhorando a oferta de oxigênio aos tecidos. O sangue que contém uma fração de glóbulos vermelhos com flexibilidade reduzida chega das arteríolas com quantidade significativamente menor de oxigênio que o sangue com 100% de glóbulos vermelhos normais na mesma concentração de hemoglobina. Esse efeito sugere que células vermelhas enrijecidas pela perda da deformabilidade adquirem menos oxigênio na sua passagem através do pulmão caracterizando que a capacidade de difusão pulmonar de oxigênio é função direta da deformabilidade de hemácias^(70, 71).

Uma vez que a pentoxifilina também tem a capacidade de melhorar a hemorreologia pela sua ação sobre a deformabilidade das células vermelhas, facilitando-a, alguns autores a têm utilizado em estudos clínicos e experimentais envolvendo o processo de isquemia e reperfusão com resultados que mostram melhora do estado circulatório com melhora da oferta de oxigênio aos tecidos⁽⁷²⁻⁷⁴⁾.

Considerando-se as propriedades hemorreológicas descritas acima, a melhora da deformabilidade oferecida pela pentoxifilina não foi suficiente para melhorar a captação de oxigênio nas arteríolas pulmonares. Porém, quando se soma a correção da deformabilidade à correção da viscosidade sanguínea, ou seja, quando se corrige mais de um parâmetro hemorreológico, como é capaz de efetuar a associação SH+PTX, as células

vermelhas passam a adquirir maior quantidade de oxigênio nas arteríolas pulmonares justificando os resultados obtidos.

Excesso de base (BE), pH, bicarbonato (BIC) e lactato séricos são parâmetros bem estabelecidos como indicadores metabólicos de gravidade de choque e hipoperfusão e como parâmetros de avaliação dos efeitos da intervenção em tais condições. Eles oferecem a representação do estado de hipóxia tecidual e são apropriados para medir a extensão da hipoperfusão^(75, 76).

O lactato sérico, quando comparado com BE, BIC e pH séricos, é mais relevante na avaliação da acidose metabólica. Tal fato poderia ser atribuído à grande quantidade de mecanismos fisiológicos compensatórios para manter os valores de BE, BIC e pH dentro da normalidade^(18, 75).

Os níveis de lactato sérico estão direta e claramente relacionados com a intensidade do estado de hipoperfusão esplâncnica^(3, 17-20).

Assim como Abrahão *et al* ⁽¹⁷⁾ (2004) estudaram o valor do lactato sérico em modelo de pré condicionamento isquêmico em ratos submetidos a I/R mesentérica, diversos autores determinaram a dosagem de lactato sérico como marcador de hipoxemia tecidual^(17, 18, 20, 21, 77).

A dosagem de lactato sérico é comumente utilizada para avaliar a eficiência na resolução de hipofluxo e hipóxia e é considerado mais sensível na identificação do risco de morte que parâmetros vitais como pressão arterial e frequência cardíaca^(19, 38, 77, 78).

Tanto a dosagem do lactato arterial quanto do venoso podem ser utilizados como parâmetro de resposta às agressões geradas pelo processo de I/R⁽²¹⁾.

A administração de SH realizada nesse estudo em dois dos grupos pode ser considerada como fator de ressuscitação do animal por promover a expansão do espaço intravascular com consequente melhora nos parâmetros microcirculatórios conforme já afirmaram alguns autores^{(10, 37, 43,}

⁷⁹⁾. Os tecidos reagem com diminuição de produção de lactato e o fígado passa a ter condição de metabolizar o lactato excessivo produzido no período de isquemia após a melhora dos parâmetros hemodinâmicos⁽³⁾.

No grupo que recebeu apenas PTX esse “fator de ressuscitação” citado acima não foi aplicado justificando a elevação dos níveis de lactato sérico.

A medida dos valores de lactato sérico nos grupos e as diferenças estatisticamente significantes encontradas estão em consonância com os achados descritos acima.

Na avaliação realizada aos 80 minutos de reperfusão observa-se a importância da solução salina hipertônica utilizada com fator de expansão intravascular promovendo a ressuscitação dos animais.

Gonzales *et al*⁽³⁴⁾, em 2006, avaliaram o efeito de diferentes concentrações de solução salina hipertônica em modelo experimental de isquemia mesentérica por oclusão arterial em ratos. Compararam o grau de lesão de mucosa intestinal após I/R em um grupo sem tratamento com grupos nos quais foi utilizada solução salina hipertônica a 2,5%, 5%, 7,5% e 10%. Os autores relataram um menor grau de lesão intestinal quando a concentração de 7,5% foi utilizada. Assim como no intestino, o grau de lesão pulmonar no grupo tratado com solução salina a 7,5% também foi muito menor quando comparado ao grupo sem tratamento, com significância estatística.

Senner *et al*⁽³²⁾ (2001) avaliaram o efeito da pentoxifilina em I/R intestinal e afirmaram que a pentoxifilina tem a propriedade de prevenir o desenvolvimento de lesão tecidual pois inibe a estimulação de polimorfonucleares e a produção de radicais livres de oxigênio.

A propriedade da pentoxifilina para inibir o TNF- α foi demonstrada por Travadi *et al*⁽⁴²⁾, em 2006. Em um modelo experimental de ECN em ratos,

ele verificou que o tratamento dos animais com pentoxifilina foi capaz de atenuar de forma significativamente o grau de lesão da mucosa intestinal.

Em publicação recente, Marqui et al⁽²⁰⁾ (2011) demonstraram que o pré tratamento com pentoxifilina no processo de I/R intestinal acarreta menor grau de lesão pulmonar. As concentrações de proteínas em lavado brônquico e de TNF- α em tecido pulmonar homogeneizado foram menores nos animais que receberam PTX em três aplicações: antes da isquemia, antes da reperfusão e durante a reperfusão intestinal.

Pela avaliação dos critérios de Chiu et al⁽⁵⁰⁾ (1970) para lesão intestinal perante isquemia/reperfusão, também pudemos demonstrar que o grupo IR apresentou maior grau de lesão de mucosa intestinal que os grupos que receberam tratamento em conformidade com a literatura existente.

A capacidade de restaurar o fluxo sanguíneo em território mesentérico oferecida pelo tratamento com solução salina hipertônica acarreta menor grau de lesão de mucosa intestinal e faz com que menor quantidade de radicais livres de oxigênio e outros metabólitos deletérios ganhem a circulação sistêmica e atinjam o pulmão, como órgão alvo da reperfusão intestinal como afirma Vincenzi et al⁽⁷⁹⁾ em estudo recente (2009) quando comparou o uso de ringer lactato (RL) com solução salina hipertônica em duas concentrações diferentes: a 7,5% e a 3%.

Em seu estudo experimental de choque em ratos, Vincenzi (2009) também mostrou que ambos os grupos tratados com solução salina hipertônica tiveram resultados semelhantes e diferiram de maneira estatisticamente significativa do grupo tratado com RL quando avaliou o grau de lesão intestinal e pulmonar.

A proteção contra a lesão pulmonar em decorrência de I/R em território mesentérico também foi estudada por An et al⁽¹²⁾ (2007) ao utilizar um agente anti-TNF- α quando o animal foi submetido a I/R intestinal. Os autores observaram a preservação da arquitetura alveolar.

No presente estudo, observou-se o mesmo resultado em relação a histologia pulmonar em relação aos achados de literatura. A aplicação de PTX resultou em menor dano ao parênquima pulmonar.

A ação anti-inflamatória da solução salina hipertônica já foi demonstrada pela sua utilização experimental em algumas doenças e após I/R mesentérica^(79, 80).

Coelho *et al*⁽⁸⁰⁾, em 2010, testaram o efeito da SH em modelo experimental de pancreatite aguda em ratos e demonstraram uma diminuição significativa da expressão de COX 2 e dos níveis séricos de TNF- α por ELISA sanduiche a partir de homogenados de tecido nos animais tratados em relação aos não tratados ou tratados com solução salina isotônica.

O bloqueio da produção de TNF α pela pentoxifilina acontece pela ativação da adenil ciclase e aumento da concentração de AMP-c intracelular⁽⁴⁶⁾. Este por sua vez, diminui a quantidade de ácido araquidônico que sofre peroxidação. O efeito global é a diminuição das concentrações sistêmicas e locais de agentes inflamatórios como a ciclooxygenase^(25, 81).

Ambas as substancias, SH e PTX, tem a propriedade de diminuir a produção de TNF α e consequentemente inibir a cascata inflamatória e a síntese de COX 2 a partir do ácido araquidônico, amenizando a resposta inflamatória sistêmica responsável pela falência de múltiplos órgãos^(79, 80).

A somatória dos efeitos anti-inflamatórios das soluções no grupo SH+PTX foi suficiente para a redução do processo, o que não aconteceu nos grupos onde as soluções foram utilizadas separadamente (SH e PTX).

Há que se lembrar que, antes de chegar aos pulmões, parte dos metabólitos produzidos por I/R em território esplâncnico foi metabolizado pelo fígado e que o tratamento com solução salina hipertônica restaurou, pelo menos em parte, a microcirculação hepática e intestinal e a função metabólica hepática^(3, 20). Assim, os animais dos grupo que receberam

tratamento com SH+PTX mostraram essa diferença estatisticamente significativa na avaliação de expressão de COX 2 em tecido pulmonar.

A redução da expressão de COX 2 pode não estar associada com as alterações histológicas evidenciadas ao estudo em HE, conforme demonstrou Coelho (2010)⁽⁸⁰⁾, sugerindo que o marcador estudado não é o único responsável pelas lesões teciduais decorrentes do fenômeno de I/R. Dessa forma, justifica-se o fato de não se estabelecer uma co-relação direta entre a lesão histológica identificada e a expressão de COX 2 no tecido intestinal.

Assim como o TNF α é um indutor da cascata inflamatória, ele também funciona como deflagrador da via extrínseca do processo de apoptose^(12, 31).

A inibição da lesão tecidual com consequente morte celular em síndromes isquêmicas intestinais pode não só reduzir a quantidade de intestino a ser ressecado mas também afetar a gravidade da resposta inflamatória sistêmica⁽⁵⁹⁾.

No evento morte celular após a lesão por I/R, coexistem a necrose e a apoptose. Na necrose observa-se que as membranas perdem sua integridade e o conteúdo intracelular geralmente extravasa, causando inflamação no tecido adjacente. Na apoptose a membrana plasmática da célula permanece intacta e sua estrutura é alterada sendo fagocitada rapidamente, sem extravasamento do seu conteúdo e sem desencadeamento de reação inflamatória^(27, 51).

O início da apoptose ocorre por sinais de duas vias, extrínseca e intrínseca, que convergem para ativar as caspases. A via extrínseca, deflagrada por estímulos externos, através de receptores específicos na superfície celular, chamados de receptores de morte celular^(12, 31). A estimulação de receptores de morte celular da superfamília de receptores de TNF como CD95 ou TRIAL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) resulta em ativação de caspase-8 que pode propagar a sinalização de apoptose por clivagem direta das caspases efetoras como a caspase-3^(12, 31).

A via intrínseca, ou mitocondrial, é ativada por estímulos internos de estresse intracelular, tais como, lesão do DNA, perturbações no ciclo celular ou nas vias metabólicas^(12, 26, 31).

A relação entre as vias intrínseca e extrínseca existe em diferentes níveis. Uma vez que o receptor de membrana é estimulado (via extrínseca), a ativação da caspase-8 resulta em clivagem de Bid, uma proteína da família Bcl-2, que por sua vez transloca para a mitocôndria e libera citocromo c dando início à via intrínseca⁽¹²⁾. A clivagem da caspase-6 na via mitocondrial serve de retroalimentação para estímulo da via extrínseca pela clivagem de caspase-8⁽³¹⁾.

As caspases, proteases que existem como pró-enzimas ativas, sofrem uma clivagem para serem ativadas e efetivar a apoptose. O processo pode ser dividido em uma fase de atividade catalítica ativa das caspases e uma fase efetora, na qual as caspases atuam promovendo a morte celular. Entre as caspases efetoras estão as caspases 3, 6 e 7. Em especial, a clivagem da caspase-3 ativa a Dnase citoplasmática clivando um inibidor da enzima e induzindo a clivagem internucleossomal do DNA. Sua importância tem sido demonstrada com inibidores da caspase no bloqueio da apoptose^(27, 82).

Em virtude do exposto, foi utilizada a marcação imuno-histoquímica para avaliação da expressão de caspase-3 clivada. Outros autores também tem usado essa técnica imuno-histoquímica para a marcação da caspase-3 clivada^(12, 83, 84).

Ao avaliar a ocorrência de apoptose após infusão de SH, Gonzalez *et al*⁽⁸⁴⁾ (2005) afirma que a SH aumenta a perfusão tecidual e assim limita o insulto isquêmico. Tal ocorrência faz com que o metabolismo celular se restabeleça e haja produção de ATP em quantidade suficiente para que a apoptose, paradoxalmente, passe a ocorrer com maior intensidade.

A utilização de inibidores da caspase tem pouco efeito sobre a maioria das células lesadas por I/R que acabam por morrer pelo processo de necrose, conforme afirma Farber *et al*⁽⁵⁹⁾ (1999). No entanto, podem permitir

a recuperação de uma população de células que foram moderadamente lesadas e que seguiriam o curso da apoptose. O resgate das células lesadas pode ter significado em termos de função do órgão e dos efeitos sistêmicos da lesão tecidual.

A atuação da SH na inibição da apoptose foi estudada por Murao *et al*⁽⁸⁵⁾ (2003). Em sua publicação, os autores afirmam que a solução salina hipertônica seria capaz de ativar p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) em neutrófilos e células T que por sua vez funciona como um indutor da produção de HSP (heat shock proteíne) que é um fator inibidor da via extrínseca da apoptose. Concluem afirmando que a redução da lesão tecidual no intestino poderia prevenir a translocação bacteriana e a liberação de endotoxinas para a circulação e consequentemente haveria uma atenuação da resposta à I/R.

A maneira pela qual a HSP atua na inibição da via extrínseca da apoptose não está bem estabelecido, porém, Mallick *et al*⁽⁸⁶⁾ (2004), em sua revisão sobre estratégias de proteção intestinal à síndrome isquêmica, cita um provável mecanismo de inibição de produção de leucotrieno-B₄ e subsequente inibição de quimiotaxia e ativação de neutrófilos.

A avaliação da expressão de caspase-3 clivada em citoplasma de tecido intestinal dos animais submetidos a I/R revelou que houve uma menor marcação citoplasmática no grupo SH.

Ao se avaliar a expressão citoplasmática de caspase-3 clivada no tecido pulmonar dos animais de experimentação, evidenciou-se menor grau de expressão nos grupos tratados com pentoxifilina em relação aos grupo IR e SH. Aqui, mais uma vez, se constata que a propriedade de bloqueio de TNF- α que a pentoxifilina apresenta foi preponderante fazendo com que a via extrínseca da apoptose não fosse deflagrada de maneira tão intensa quanto o que ocorreu no grupo sem tratamento e no grupo tratado apenas com SH.

A via mitocôndria-dependente (intrínseca) é amplamente regulada pela família das proteínas Bcl-2 que incluem Bid, Bax e Bak. Estas proteínas promovem a liberação de citocromo c, ao passo que Bcl-2 suprime esse processo^(12, 31).

Já se demonstrou que a deflagração da via extrínseca da apoptose é insensível à proteína Bcl-2⁽⁸⁷⁾.

Aban *et al*⁽¹¹⁾ (2004), ao estudar a expressão de caspase-3 clivada e Bcl-2 quando se aplica o pré condicionamento isquêmico ao processo de I/R intestinal observou que a expressão de caspase-3 clivada e de Bcl-2 estão dinamicamente relacionadas no fenômeno de apoptose.

Na avaliação de Coopersmith *et al*⁽²⁸⁾ (1999), Bcl-2 funcionaria como regulador anti-apoptótico ao impedir ou atrasar a liberação de citocromo c, talvez pela sua capacidade de influenciar a criação, manutenção ou a função dos canais de membrana mitocondrial e que intervenções que elevassem os níveis de Bcl-2 ou que melhorassem a sua função poderiam ser úteis para reduzir danos produzidos não só pela I/R mas também por outros fatores indutores de apoptose como a irradiação γ . Em estudo mais atual, o autor constatou que a sobreexpressão de Bcl-2 em ratos transgênicos evitou a lesão da mucosa intestinal conferindo maior sobrevivência dos animais submetidos a sepse⁽⁸⁸⁾.

Em estudo recente, Modello *et al*⁽⁸⁹⁾ (2010) demonstraram que o emprego de glutamina nos animais submetidos a I/R em território esplâncnico tem a capacidade de atenuar a produção de TNF- α . Por meio de análise por Western blot e de imuno-histoquímica, demonstraram que ocorre diminuição da expressão de Bcl-2 no tecido intestinal de ratos submetidos a I/R. O uso de glutamina fez com que essa expressão fosse aumentada no período de reperfusão. Sugerem ainda que a proteção tecidual à apoptose deveria ser pré requisito na abordagem antiinflamatória.

No presente estudo, os três grupos tratados apresentaram maior expressão de Bcl-2 na avaliação imuno-histoquímica do tecido intestinal.

Muito embora o grau de expressão nos grupos HS e PTX fosse por volta de duas vezes maior que no grupo IR, somente o grupo SH+PTX apresentou diferença estatisticamente significante quando comparado ao grupo sem tratamento.

A proteção da apoptose verificada pelo aumento da expressão de Bcl-2 ao se atenuar a produção de TNF- α vem de encontro aos resultados obtidos no presente estudo que utilizou pentoxifilina e solução salina hipertônica com essa intenção.

A expressão de caspase-3 clivada por vezes é de difícil interpretação visto que na ocorrência de uma lesão tecidual intensa o mecanismo predominante de morte celular passa a ser a necrose e dessa forma a apoptose ficaria menos evidente⁽²⁶⁾.

Por outro lado, sendo a apoptose um mecanismo de morte celular dependente de ATP, a depleção dessa fonte energética acarretaria queda na expressão das proteínas proapoptóticas. A recuperação do fornecimento energético pode favorecer a recuperação tecidual e assim a deflagração de apoptose como mecanismo de regeneração poderia ser superestimada⁽³⁴⁾.

A avaliação dos resultados de expressão da caspase-3 clivada em tecido intestinal e pulmonar mostrou uma menor ocorrência da expressão citoplasmática do tecido intestinal no grupo tratado com SH, assim como em tecido pulmonar no grupo tratado com PTX.

Numa comparação conjunta do grau de lesão tecidual determinado pela coloração em HE e a imunomarcação da caspase-3 clivada citoplasmática foi observado que, no intestino, o grau de lesão dos grupos SH e PTX e SH+PTX foi semelhante. A pentoxifilina ofereceu substrato para que a apoptose fosse mais intensa que no grupo SH com o qual manteve uma diferença estatisticamente significante na avaliação da expressão de caspase-3 clivada citoplasmática.

Tais resultados poderiam dar a impressão de que houve maior proteção do tecido intestinal pela SH, porém, a interpretação mais confiável seria a seguinte: houve menor deflagração de apoptose decorrente da menor quantidade de substrato ou ainda, por menor necessidade de regeneração tecidual.

Por outro lado, ao analisar os resultados obtidos nas amostras de tecido pulmonar verificamos que o grau de lesão, muito embora sem significância estatística, foi quase duas vezes maior no grupo PTX que no grupo SH.

Em contrapartida, a marcação citoplasmática de caspase-3 clivada foi menor no grupo PTX. Nesse aspecto leva-se em consideração a ação da PTX no bloqueio da produção de TNF- α ^(32, 40-42). A fonte primária de formação de TNF- α é o intestino que foi submetido a I/R. O sangue drenado pela veia mesentérica ganharia a veia porta e através do fígado chegaria até a veia cava inferior e desta aos pulmões com menor concentração de TNF- α . Esse fenômeno iria determinar uma menor deflagração de apoptose pela via extrínseca e consequente redução na expressão citoplasmática de caspase-3 clivada.

Quando foi avaliada a expressão de uma proteína anti-apoptótica pode ser verificado o grau de proteção que os tratamentos puderam oferecer aos tecidos estudados. Assim, por uma ação sinérgica de HS e PTX houve melhora da circulação esplâncica^(40, 42, 43) e restauração da microcirculação intestinal, hepática e pulmonar^(10, 40, 42). Dessa forma, há restabelecimento da função hepatocelular.

Ocorreram ainda a redução do edema das hemácias e das células entoteliais⁽¹⁰⁾, aumentando a oxigenação da mucosa⁽⁴⁰⁾ e a diminuição da produção de citocinas, em especial de TNF- α ⁽⁴²⁾.

Outros fatos também relevantes foram a eliminação da produção de RLO^(10, 42), limitando o sequestro e a marginação de PMN^(42, 43), a redução da translocação bacteriana, a vasodilatação^(10, 72), a restauração da

capacidade de deformação das hemácias^(66, 67, 69), menor acúmulo de albumina nos tecidos^(32, 41), diminuindo a viscosidade sanguínea e por consequência a força de cisalhamento^(66, 72)

A somatória desses fatores citados acima foi o que proporcionou maior expressão de Bcl-2 determinando que o bloqueio à deflagração da apoptose em função da agressão pelo processo de I/R mesentérica fosse mais intenso, garantindo o menor grau de lesão tecidual como o encontrado na avaliação histológica.

Do ponto de vista assistencial, a melhora das perspectivas de sobrevida em recém nascidos de prematuridade extrema e de baixo ou muito baixo peso se baseia na evolução de cuidados e terapias adotadas nas últimas décadas. O controle da hipotermia, o suporte ventilatório, o uso de corticosteróides no período ante-natal e do surfactante no período neonatal, os avanços em nutrição parenteral e antibioticoterapia, entre outros, contribuíram para que esses recém nascidos, de prognóstico muito reservado, tivessem maior chance de sobreviver⁽⁹⁰⁾.

Em contra partida, pacientes portadores de malformações congênitas do trato digestório, gastrosquise, onfalocele, ECN, disganglionoses intestinais, entre outras, com potencial para evoluir para a Síndrome do intestino curto e que são passíveis de tratamento com transplante intestinal, também passaram a ter maior sobrevida⁽⁹¹⁾.

O emprego de estratégias que visam a proteção do enxerto intestinal e de outros órgãos que sofrem as consequências do transplante têm sido amplamente estudadas. Aspectos como a recuperação da população celular por meio da inibição da apoptose por estímulo à produção de proteínas anti-apoptóticas⁽⁵⁹⁾, pré-condicionamento isquêmico^(11, 86) e bloqueio da produção de interleucinas e indutores de inflamação^(34, 36, 79) trazem contribuições que podem impactar no prognóstico desses pacientes.

Transplantes incluindo intestino delgado, cólon, reto e ânus podem representar um grande benefício em pacientes que, além da indicação de

transplante intestinal, também apresentam disfunção anorretal⁽⁹²⁾. Essa modalidade de enxerto preserva o sistema neuroentérico, a válvula ileocecal e o esfíncter anal interno e permite a avaliação da regeneração intestinal e da inervação anorretal por meio de manometria anorretal⁽⁹³⁾.

Apesar dos estudos clínicos e laboratoriais recentes em I/R intestinal com pentoxifilina e solução salina hipertônica, e da utilização dessas substâncias serem de uso frequente no meio hospitalar, muito se tem a estudar quanto aos mecanismos de ação e formas de associação com outras medidas que permitem entender melhor as consequências e as intervenções no processo de isquemia e reperfusão em território mesentérico.

A prevenção da lesão de órgãos a distância continua a ser um desafio a ser superado.

6. Conclusões

6. Conclusões

No presente estudo ficou demonstrado que o uso de pentoxifilina associada à solução salina hipertônica a 7,5% no processo de I/R intestinal ofereceu a melhor proteção aos tecidos tanto no nível intestinal quanto no pulmonar por:

- 6.1. Atenuar as alterações metabólicas caracterizadas pelas mensurações de saturação de oxigênio e lactato,
- 6.2. Apresentar menor grau de lesão tecidual na avaliação histológica por HE,
- 6.3. Diminuir o processo inflamatório pela expressão citoplasmática de COX 2,
- 6.4. Reduzir a deflagração da apoptose pela diminuição da expressão citoplasmática de caspase-3 clivada e aumento da expressão citoplasmática de Bcl-2.

7. Referências

7. Referências

1. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB et al. Systemic evaluation on ischemia and reperfusion injury of splanchnic organs in rats. *Acta Cir Bras.* 2009;24(4):290-5.
2. Guzman-de la Garza FJ, Camara-Lemmarroy CR, Alarcon-Galvan G et al. Different patterns of intestinal response to injury after arterial, venous or arteriovenous occlusion in rats. *World J Gastroenterol.* 2009;15(31):3901-7.
3. Kadam P, Patil N, Bhate J et al. The serial estimation of serum lactate, pyruvate, and base deficit in trauma patients with adequate resuscitation and management. *Indian J Anesth.* 2004;48(2):138-41.
4. Schaefer N, Tahara K, Schmidt J, Zobel S et al. Mechanism and impact of organ harvesting and ischemia-reperfusion injury within the graft muscularis in rat small bowel transplantation. *Transplant Proc.* 2006;38(6):1821-2.
5. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. *Acta Cir Bras.* 2005;20(4):336-43.
6. Chokshi NK, Guner YS, Hunter CJ, Upperman JS et al. The role of nitric oxide in intestinal epithelial injury and restitution in neonatal necrotizing enterocolitis. *Semin Perinatol.* 2008;32(2):92-9.
7. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001;94(6):1133-8.

8. Moore EE, Moore FA, Franciose RJ et al. The postischemic gut serves as a priming bed for circulating neutrophils that provoke multiple organ failure. *J Trauma*. 1994;37(6):881-7.
9. Cruz RJ, Garrido AG, Ribeiro CM et al. Regional blood flow distribution and oxygen metabolism during mesenteric ischemia and congestion. *J Surg Res*. 2010;161(1):54-61.
10. Poli-de-Figueiredo LF, Cruz RJ, Sannomiya P, Rocha ESM. Mechanisms of action of hypertonic saline resuscitation in severe sepsis and septic shock. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*. 2006;6(2):201-6.
11. Aban N, Cinel L, Tamer L et al. Ischemic preconditioning reduces caspase-related intestinal apoptosis. *Surg Today*. 2005;35(3):228-34.
12. An S, Hishikawa Y, Liu J, Koji T. Lung injury after ischemia-reperfusion of small intestine in rats involves apoptosis of type II alveolar epithelial cells mediated by TNF-alpha and activation of Bid pathway. *Apoptosis*. 2007;12(11):1989-2001.
13. Schlichting E, Grotmol T, Kahler H et al. Alterations in mucosal morphology and permeability, but no bacterial or endotoxin translocation takes place after intestinal ischemia and early reperfusion in pigs. *Shock*. 1995;3(2):116-24.
14. Park JJ, Chung KY, Nam YS. Two-day fasting prior to intestinal ischemia-reperfusion injury on bacterial translocation in rats. *J Invest Surg*. 2011;24(6):262-6.
15. Vollmar B, Menger MD. Intestinal ischemia/reperfusion: microcirculatory pathology and functional consequences. *Langenbecks Arch Surg*. 2011 Jan;396(1):13-29.
16. Zhou JL, Jin GH, Yi YL et al. Role of nitric oxide and peroxynitrite anion in lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. *World J Gastroenterol*. 2003;9(6):1318-22.

17. Abrahao MS, Montero EF, Junqueira VB et al. Biochemical and morphological evaluation of ischemia-reperfusion injury in rat small bowel modulated by ischemic preconditioning. *Transplant Proc.* 2004;36(4):860-2.
18. Hobbs TR, O'Malley JP, Khouangsathiene S, Dubay CJ. Comparison of lactate, base excess, bicarbonate, and pH as predictors of mortality after severe trauma in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Comp Med.* 2010;60(3):233-9.
19. Jansen TC, van Bommel J, Mulder PG et al. The prognostic value of blood lactate levels relative to that of vital signs in the pre-hospital setting: a pilot study. *Crit Care.* 2008;12(6):160.
20. Marqui CE, Silva HC, Ferez D et al. Pretreatment with pentoxifylline attenuates lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Acta Cir Bras.* 2011;26(6):438-44.
21. Blomkalns AL. Lactate - A marker for sepsis and Trauma2007: Available from: http://www.emcreg.org/publications/monographs/acep/2006/alb_acep2006.pdf.
22. Kummer CL, Coelho TC. Cyclooxygenase-2 inhibitors nonsteroid anti-inflammatory drugs: current issues. *Rev Bras Anesthesiol.* 2002;52(4):498-512.
23. Perazella MA, Tray K. Selective cyclooxygenase-2 inhibitors: a pattern of nephrotoxicity similar to traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am J Med.* 2001;111(1):64-7.
24. Hilario MO, Terreri MT, Len CA. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. *J Pediatr (Rio J).* 2006;82(5 Suppl):S206-12.
25. Modzelewski B, Janiak A. Pentoxifylline as a cyclooxygenase (cox-2) inhibitor in experimental sepsis. *Med Sci Monit.* 2004;10(7):233-7.

26. Jilling T, Lu J, Jackson M, Caplan MS. Intestinal epithelial apoptosis initiates gross bowel necrosis in an experimental rat model of neonatal necrotizing enterocolitis. *Pediatr Res*. 2004;55(4):622-9.
27. Zhou Y, Wang Q, Evers BM, Chung DH. Signal transduction pathways involved in oxidative stress-induced intestinal epithelial cell apoptosis. *Pediatr Res*. 2005;58(6):1192-7.
28. Coopersmith CM, O'Donnell D, Gordon JI. Bcl-2 inhibits ischemia-reperfusion-induced apoptosis in the intestinal epithelium of transgenic mice. *Am J Physiol*. 1999;276(3):677-86.
29. Misao J, Hayakawa Y, Ohno M et al. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction. *Circulation*. 1996;94(7):1506-12.
30. Watson AJ, Pritchard DM. Lessons from genetically engineered animal models. VII. Apoptosis in intestinal epithelium: lessons from transgenic and knockout mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000;278(1):1-5.
31. Fulda S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene*. 2006;25(34):4798-811.
32. Sener G, Akgun U, Satioglu H et al. The effect of pentoxifylline on intestinal ischemia/reperfusion injury. *Fundam Clin Pharmacol*. 2001;15(1):19-22.
33. Husain KD, Stromberg PE, Javadi P et al. Bcl-2 inhibits gut epithelial apoptosis induced by acute lung injury in mice but has no effect on survival. *Shock*. 2003;20(5):437-43.
34. Gonzalez EA, Kozar RA, Suliburk JW et al. Conventional dose hypertonic saline provides optimal gut protection and limits remote organ injury after gut ischemia reperfusion. *J Trauma*. 2006;61(1):66-73.

35. Jonas J, Heimann A, Strecker U, Kempinski O. Hypertonic/hyperoncotic resuscitation after intestinal superior mesenteric artery occlusion: early effects on circulation and intestinal reperfusion. *Shock*. 2000;14(1):24-9.
36. Attuwaybi B, Kozar RA, Gates KS et al. Hypertonic saline prevents inflammation, injury, and impaired intestinal transit after gut ischemia/reperfusion by inducing heme oxygenase 1 enzyme. *J Trauma*. 2004;56(4):749-58.
37. Rocha-e-Silva M, Poli de Figueiredo LF. Small volume hypertonic resuscitation of circulatory shock. *Clinics (Sao Paulo)*. 2005;60(2):159-72.
38. Montero EF, Abrahao MS, Koike MK et al. Intestinal ischemia and reperfusion injury in growing rats: hypothermia and N-acetylcysteine modulation. *Microsurgery*. 2003;23(5):517-21.
39. Braz JR, do Nascimento P, Paiva Filho O et al. The early systemic and gastrointestinal oxygenation effects of hemorrhagic shock resuscitation with hypertonic saline and hypertonic saline 6% dextran-70: a comparative study in dogs. *Anesth Analg*. 2004;99(2):536-46.
40. Cruz RJ, Yada-Langui MM, de Figueiredo LF et al. The synergistic effects of pentoxifylline on systemic and regional perfusion after hemorrhage and hypertonic resuscitation. *Anesth Analg*. 2006;102(5):1518-24.
41. Lauterbach R, Pawlik D, Kowalczyk D et al. Effect of the immunomodulating agent, pentoxifylline, in the treatment of sepsis in prematurely delivered infants: a placebo-controlled, double-blind trial. *Crit Care Med*. 1999;27(4):807-14.
42. Travadi J, Patole S, Charles A, Dvorak B et al. Pentoxifylline reduces the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Pediatr Res*. 2006;60(2):185-9.
43. Yada-Langui MM, Anjos-Valotta EA, Sannomiya P et al. Resuscitation affects microcirculatory polymorphonuclear leukocyte behavior after

hemorrhagic shock: role of hypertonic saline and pentoxifylline. *Exp Biol Med.* 2004;229(7):684-93.

44. Taha MO, Miranda-Ferreira R, Simoes RS et al. Intestinal ischemia-reperfusion is attenuated by treatment with atenolol in rabbits. *Transplant Proc.* 2010;42(2):451-3.

45. Ramakers BP, Pickkers P. Adenosine-mediated attenuation of the innate immune response for only those who need it? The tailored potential of pentoxifylline. *Shock.* 2010;34(1):105-6.

46. Kreth S, Ledderose C, Luchting B et al. Immunomodulatory properties of pentoxifylline are mediated via adenosine-dependent pathways. *Shock.* 2010;34(1):10-6.

47. Yang S, Zhou M, Koo DJ et al. Pentoxifylline prevents the transition from the hyperdynamic to hypodynamic response during sepsis. *Am J Physiol.* 1999;277(3):1036-44.

48. Haque KN, Pammi M. Pentoxifylline for treatment of sepsis and necrotizing enterocolitis in neonates. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011(10):CD004205.

49. Lagoa CE, de Figueiredo LF, Cruz RJ et al. Effects of volume resuscitation on splanchnic perfusion in canine model of severe sepsis induced by live *Escherichia coli* infusion. *Crit Care.* 2004;8(4):221-8.

50. Chiu CJ, McArdle AH, Brown R et al. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. I. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg.* 1970;101(4):478-83.

51. Souza M. Avaliação morfológica e imunohistoquímica tardia do fígado e do pulmão após lesão de isquemia e reperfusão hepática seletiva com modulação pelo précondicionamento isquêmico ou pela N-acetilcisteína.[Tese] São Paulo: UNIFESP; 2007.

52. Perrone G, Santini D, Zagami M et al. COX-2 expression of ampullary carcinoma: correlation with different histotypes and clinicopathological parameters. *Virchows Arch.* 2006;449(3):334-40.
53. Vincenti M, Behrends M, Dang K et al. Induction of intestinal ischemia reperfusion injury by portal vein outflow occlusion in rats. *J Gastroenterol.* 2010;45(11):1103-10.
54. McKinsey J, Gewertz B. Isquemia mesentérica. In: Interlivros, editor. Schwartz LB, Gewertz BL: Isquemia mesentérica. Rio de Janeiro, 1997. p. 313-24.
55. Tsuchida Y, Aoki N, Fukuda O et al. Changes in hemodynamics in jejunal flaps of rabbits due to ischemia, venous congestion, and reperfusion as measured by means of colored microspheres. *Plast Reconstr Surg.* 1998;101(1):147-54.
56. Kimura M, Kataoka M, Kuwabara Y et al. Real-time energy metabolism of intestine during arterial versus venous occlusion in the rat. *J Gastroenterol.* 2003;38(9):849-53.
57. Higa OH, Parra ER, Ab'Saber AM et al. Protective effects of ascorbic acid pretreatment in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion injury: a histomorphometric study. *Clinics (Sao Paulo).* 2007;62(3):315-20.
58. Rosenblum J, Boyle C, Schwartz L. Circulação mesentérica: anatomia e fisiologia. Interlivros. Rio de Janeiro, 1997.
59. Farber A, Connors JP, Friedlander RM et al. A specific inhibitor of apoptosis decreases tissue injury after intestinal ischemia-reperfusion in mice. *J Vasc Surg.* 1999;30(4):752-60.
60. Guan Y, Worrell RT, Pritts TA, Montrose MH. Intestinal ischemia-reperfusion injury: reversible and irreversible damage imaged in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;297(1):187-96.

61. Chen CF, Leu FJ, Chen HI et al. Ischemia/reperfusion-induced low reactivity of the rat superior mesenteric vascular bed is associated with expression of nitric oxide synthases. *Transplant Proc.* 2006;38(7):2216-20.
62. Taha MO, Goncalves PF, Vidigal RO et al. Protective effects of heparin on hepatic ischemia and reperfusion lesions in rabbits. *Transplant Proc.* 2009;41(3):812-5.
63. de Felipe J, Timoner J, Velasco IT et al. Treatment of refractory hypovolaemic shock by 7.5% sodium chloride injections. *Lancet.* 1980;2(8202):1002-4.
64. Velasco IT, Pontieri V, Rocha e Silva M, Lopes OU. Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *Am J Physiol.* 1980;239(5):664-73.
65. Harris E, Schulzke SM, Patole SK. Pentoxifylline in preterm neonates: a systematic review. *Paediatr Drugs.* 2010;12(5):301-11.
66. Zhao L, Wang B, You G et al. Effects of different resuscitation fluids on the rheologic behavior of red blood cells, blood viscosity and plasma viscosity in experimental hemorrhagic shock. *Resuscitation.* 2009;80(2):253-8.
67. McHedlishvili G. Disturbed blood flow structuring as critical factor of hemorheological disorders in microcirculation. *Clin Hemorheol Microcirc.* 1998;19(4):315-25.
68. Koppensteiner R. Blood rheology in emergency medicine. *Semin Thromb Hemost.* 1996;22(1):89-91.
69. Zaets SB, Berezina TL, Morgan C et al. Effect of trauma-hemorrhagic shock on red blood cell deformability and shape. *Shock.* 2003;19(3):268-73.
70. Cabrales P. Effects of erythrocyte flexibility on microvascular perfusion and oxygenation during acute anemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;293(2):H1206-15.

71. Betticher DC, Reinhart WH, Geiser J. Effect of RBC shape and deformability on pulmonary O₂ diffusing capacity and resistance to flow in rabbit lungs. *J Appl Physiol*. 1995;78(3):778-83.
72. Ernst E. Haemorheological treatment of ischaemia--facts or fancy? *J R Soc Med*. 1991;84(11):639-40.
73. Horvath B, Vekasi J, Kesmarky G, Toth K. In vitro antioxidant properties of pentoxifylline and vinpocetine in a rheological model. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2008;40(2):165-6.
74. Muravyov AV, Yakusevich VV, Chuchkanov FA et al. Hemorheological efficiency of drugs, targeting on intracellular phosphodiesterase activity: in vitro study. *Clin Hemorheol Microcirc*. 2007;36(4):327-34.
75. Englehart MS, Schreiber MA. Measurement of acid-base resuscitation endpoints: lactate, base deficit, bicarbonate or what? *Curr Opin Crit Care*. 2006;12(6):569-74.
76. Evennett NJ, Petrov MS, Mittal A, Windsor JA. Systematic review and pooled estimates for the diagnostic accuracy of serological markers for intestinal ischemia. *World J Surg*. 2009;33(7):1374-83.
77. McNelis J, Marini CP, Jurkiewicz A et al. Prolonged lactate clearance is associated with increased mortality in the surgical intensive care unit. *Am J Surg*. 2001;182(5):481-5.
78. Meregalli A, Oliveira RP, Friedman G. Occult hypoperfusion is associated with increased mortality in hemodynamically stable, high-risk, surgical patients. *Crit Care*. 2004;8(2):R60-5.
79. Vincenzi R, Cepeda LA, Pirani WM et al. Small volume resuscitation with 3% hypertonic saline solution decrease inflammatory response and attenuates end organ damage after controlled hemorrhagic shock. *Am J Surg*. 2009;198(3):407-14.

80. Coelho AM, Jukemura J, Sampietre SN et al. Mechanisms of the beneficial effect of hypertonic saline solution in acute pancreatitis. *Shock*. 2010;34(5):502-7.
81. Abdel-Salam OM, Baiuomy AR, El-Shenawy SM, Arbid MS. The anti-inflammatory effects of the phosphodiesterase inhibitor pentoxifylline in the rat. *Pharmacol Res*. 2003;47(4):331-40.
82. Clark JA, Lane RH, MacLennan NK et al. Epidermal growth factor reduces intestinal apoptosis in an experimental model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288(4):755-62.
83. Meyer FD. Uso da glicina na prevenção das lesões da enterocolite necrosante neonatal: estudo experimental em ratos.[Tese] São Paulo: UNIFESP; 2006.
84. Gonzalez EA, Kozar RA, Suliburk JW et al. Hypertonic saline resuscitation after mesenteric ischemia/reperfusion induces ileal apoptosis. *J Trauma*. 2005;59(5):1092-8.
85. Murao Y, Loomis W, Wolf P, Hoyt DB, Junger WG. Effect of dose of hypertonic saline on its potential to prevent lung tissue damage in a mouse model of hemorrhagic shock. *Shock*. 2003;20(1):29-34.
86. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci*. 2004;49(9):1359-77.
87. McCully JD, Wakiyama H, Hsieh YJ et al. Differential contribution of necrosis and apoptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(5):1923-35.
88. Coopersmith CM, Chang KC, Swanson PE et al. Overexpression of Bcl-2 in the intestinal epithelium improves survival in septic mice. *Crit Care Med*. 2002;30(1):195-201.

89. Mondello S, Galuppo M, Mazzon E et al. Glutamine treatment attenuates the development of ischaemia/reperfusion injury of the gut. *Eur J Pharmacol.* 2010;643(2):304-15.
90. Battin MR, Knight DB, Kuschel CA, Howie RN. Improvement in mortality of very low birthweight infants and the changing pattern of neonatal mortality: The 50-year experience of one perinatal centre. *J Paediatr Child Health.* 2012;48(7):596-9.
91. Kaufman SS, Atkinson JB, Bianchi A et al. Indications for pediatric intestinal transplantation: a position paper of the American Society of Transplantation. *Pediatr Transplant.* 2001;5(2):80-7.
92. Galvao FH, Seid VE, Nunes dos Santos RM et al. Anorectal transplantation. *Tech Coloproctol.* 2009;13(1):55-9.
93. Galvao FH, Waisberg DR, De Mello Vianna RM et al. Intestinal transplantation including anorectal segment in the rat. *Microsurgery.* 2012;32(1):77-9.

Anexos

Anexo 1 - Tabela de valores das variáveis na gasometria arterial

	pH			pCO ₂ (mmHg)			pO ₂ (mmHg)			Hb (mg/dl)			sO ₂ (%)			Lactato (mg/dl)			BE (mmol/l)			HCO ₃ ⁻ (mmol/l)		
	I40	R40	R80	I40	R40	R80	I40	R40	R80	I40	R40	R80	I40	R40	R80	I40	R40	R80	I40	R40	R80	I40	R40	R80
IR 1	7,26	7,12	7,02	40	53,9	56,4	130	115	158	12,5	11,2	10,3	94,6	89,7	93,6	5	40	55	-8,40	-10,80	-15,30	17,4	14,9	11,7
IR 2	7,28	7,10	7,04	53	52,9	52,9	91,1	129	149	12,3	12,9	13	96,2	90,6	94,3	7	32	60	-2,00	-12,10	-15,10	21,7	13,8	11,8
IR 3	7,22	7,14	7,15	64,7	57,7	59,7	272	265	163	12,7	12,9	13,4	97,3	97,7	97,3	6	12	13	-1,20	-8,80	-7,80	22	16,2	16,8
IR 4	7,30	7,13	7,10	46,2	56,3	55	288	304	220	13,4	15,8	14,4	97	96,8	97,6	6	18	25	-3,60	-9,80	-11,80	20,9	15,3	14
IR 5	7,26	7,21	7,05	51,6	40,2	41,6	177	131	123	13,2	15,3	15,3	96,9	98	98,2	6	25	30	-3,50	-11,00	-16,10	20,7	15,4	11,6
IR 6	7,26	7,25	7,02	44,9	41,4	48,7	293	141	146	11,1	12,8	12,2	97,5	95,7	93,8	11	27	23	-6,50	-12,50	-14,30	18,8	14,8	12,6
Média	7,26	7,16	7,06	50,07	50,40	52,38	208,52	180,83	159,83	12,53	13,48	13,10	96,58	94,75	95,80	6,83	25,67	34,33	-4,20	-10,83	-13,40	20,25	15,07	13,08
DP	0,02	0,06	0,05	8,58	7,64	6,43	87,67	81,66	32,55	0,82	1,73	1,75	1,07	3,66	2,11	2,14	9,93	18,84	2,74	1,39	3,12	1,79	0,79	2,03
SH 1	7,19	7,17	7,07	54	51,6	70	396	197	317	10,6	12,7	12,7	98,2	97,9	97,9	4	7	7	-7,40	-8,90	-9,30	17,7	16,4	15,3
SH 2	7,29	7,18	7,17	50,7	62,3	59,8	166	309	429	14,6	13,9	13,6	97,8	100	100	5	8	9	-2,10	-4,80	-6,20	21,8	19	18,1
SH 3	7,25	7,22	7,26	51,1	42,3	36,9	454	411	341	14,5	12,9	13,8	98,3	99	99	4	3	7	-4,60	-9,50	-9,50	19,7	16,4	16,8
SH 4	7,27	7,21	7,23	39,7	45,9	36,4	334	349	365	12,3	13,4	13,6	97,4	98,2	98,2	8	10	16	-8,00	-8,80	-11,40	17,8	16,8	15,3
SH 5	7,24	7,27	7,17	50,8	38,1	52,1	373	486	195	12,7	13,2	14,3	97,5	99,6	99,6	7	9	12	-5,40	-8,60	-9,00	19,2	17,4	16,2
SH 6	7,27	7,24	7,25	52,2	40,5	38	136	157	156	14,3	13,5	14,9	95	97,4	97,4	4	7	10	-3,00	-9,10	-10,00	21	16,8	16,4
Média	7,25	7,22	7,19	49,75	46,78	48,87	309,83	318,17	300,50	13,17	13,27	13,82	97,37	98,68	98,68	5,33	7,33	10,17	-5,08	-8,28	-9,23	19,53	17,13	16,35
DP	0,04	0,04	0,07	5,08	8,94	14,09	129,37	125,28	104,49	1,59	0,43	0,74	1,21	1,02	1,02	1,75	2,42	3,43	2,34	1,73	1,71	1,66	0,99	1,05
PTX 1	7,31	7,32	7,11	42,7	38,2	34,2	293	199	272	12	12,6	12,2	99	99	97,1	4	11	20	-4,20	-5,90	-8,50	20,7	19,6	16,2
PTX 2	7,16	7,43	7,24	53	26,2	22	229	223	217	12,6	11,3	11,9	97,5	96,3	96,9	3	19	58	-6,00	-12,10	-16,60	18,2	15,3	12,3
PTX 3	7,22	7,09	7,00	50	49,6	46,6	290	258	297	13,5	13,1	12,6	97,4	97,4	96	4	21	27	-6,80	-13,70	-18,10	18,1	13	10
PTX 4	7,21	7,18	7,13	46	44,6	27	270	195	212	11,6	12,3	12,5	97	96,6	96,7	5	12	49	-8,80	-10,70	-18,80	16,8	15,4	10,4
PTX 5	7,27	7,28	7,25	49,6	47,7	46,7	148	204	158	13,3	13,7	12,4	95,8	97	95,9	4	4	14	-3,80	-4,30	-6,00	20,6	20,3	19
PTX 6	7,21	7,30	7,29	54,9	42,3	41,5	250	204	269	13,7	14,1	13,6	96,9	97	97,4	6	8	11	-5,30	-5,00	-6,10	19	20	19,2
Média	7,23	7,27	7,17	49,37	41,43	36,33	246,67	213,83	237,50	12,78	12,85	12,53	97,27	97,22	96,67	4,33	12,50	29,83	-5,82	-8,62	-12,35	18,90	17,27	14,52
DP	0,05	0,12	0,11	4,47	8,48	10,36	54,09	23,68	51,21	0,86	1,01	0,58	1,04	0,95	0,60	1,03	6,47	19,34	1,84	4,04	6,11	1,53	3,09	4,17
SH+PTX 1	7,39	7,16	7,04	30,9	48,7	56,8	197	240	345	12,5	12,9	13,2	97,2	97,4	97,2	8	14	26	-5,60	-10,40	-14,00	20,2	15,5	12,4
SH+PTX 2	7,25	7,28	7,23	59,3	44,9	54	358	165	221	13,7	13,4	13,1	97,4	97,3	97	6	14	8	-1,10	-5,20	-4,70	22,2	19,6	19,6
SH+PTX 3	7,22	7,16	7,23	49,5	45,3	30,3	321	274	160	13,4	14,8	15,3	97,2	99,1	96,5	5	7	17	-6,80	-11,50	-13,80	18,1	14,7	14
SH+PTX 4	7,22	7,09	7,02	43,2	52,9	43,4	286	302	241	14,1	13,8	13,9	97,2	99,7	99,9	6	6	8	-9,20	-12,90	-18,30	16,6	13,4	10
SH+PTX 5	7,25	7,29	7,15	54,5	39,1	57,3	268	197	393	14,2	13,3	14,9	97,8	100	98,9	5	7	8	-3,20	-7,00	-8,40	20,7	18,6	16,4
SH+PTX 6	7,37	7,32	7,20	36,4	32,1	40,1	231	192	199	13,9	12,2	13,8	97,6	100	99,6	7	11	17	-4,00	-8,80	-11,30	21,3	17,6	15,2
Média	7,28	7,22	7,14	45,63	43,83	46,98	276,83	228,33	259,83	13,63	13,40	14,03	97,40	98,92	98,18	6,17	9,83	14,00	-4,98	-9,30	-11,75	19,85	16,57	14,60
DP	0,08	0,09	0,09	10,85	7,34	10,87	58,61	52,84	90,02	0,63	0,87	0,89	0,25	1,26	1,46	1,17	3,66	7,35	2,85	2,88	4,76	2,10	2,41	3,32

Anexo 2 - Ranqueamento dos grupos para HE e imunomarcadores								
	HE		COX 2		Caspase -3 clivada		Bcl-2	
	Intestino	Pulmão	Intestino	Pulmão	Intestino	Pulmão	Intestino	Pulmão
IR 1	3	2	2	3	1	2	3	2
IR 2	3	2	3	2	4	4	0	2
IR 3	3	3	3	3	4	4	1	2
IR 4	3	3	3	3	3	4	1	1
IR 5	3	3	3	3	4	3	2	2
IR 6	4	3	3	3	4	4	1	1
Média	3,17	2,67	2,83	2,83	3,33	3,50	1,33	1,67
DP	0,41	0,52	0,41	0,41	1,21	0,84	1,03	0,52
SH 1	3	0	2	2	2	3	2	4
SH 2	1	0	2	2	1	3	3	2
SH 3	1	1	3	3	2	3	3	4
SH 4	1	1	2	2	2	2	2	4
SH 5	2	0	1	1	1	4	3	4
SH 6	2	0	2	1	3	4	1	2
Média	1,67	0,33	2,00	1,83	1,83	3,17	2,33	3,33
DP	0,82	0,52	0,63	0,75	0,75	0,75	0,82	1,03
PTX 1	1	1	2	2	4	2	2	3
PTX 2	2	2	3	3	3	3	3	3
PTX 3	2	0	2	1	3	2	2	3
PTX 4	3	1	3	1	3	2	2	4
PTX 5	1	1	1	0	4	2	4	4
PTX 6	1	2	2	2	3	2	3	4
Média	1,67	1,17	2,17	1,50	3,33	2,17	2,67	3,50
DP	0,82	0,75	0,75	1,05	0,52	0,41	0,82	0,55
SH+PTX 1	0	1	2	3	2	3	3	4
SH+PTX 2	1	1	2	2	3	2	4	2
SH+PTX 3	3	2	1	1	2	2	3	4
SH+PTX 4	4	0	1	1	3	2	3	4
SH+PTX 5	2	0	0	2	3	3	4	3
SH+PTX 6	1	0	1	2	2	3	4	4
Média	1,83	0,67	1,17	1,83	2,50	2,50	3,50	3,50
DP	1,47	0,82	0,75	0,75	0,55	0,55	0,55	0,84