

Maria Lúcia de Pinho-Apezato

Lesão causada pela isquemia seguida de reperfusão em modelo experimental de transplante de intestino em porcos jovens : avaliação por meio de métodos histológicos, imunoistoquímicos e de biologia molecular

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

Programa de: Clínica Cirúrgica

Orientador: Dr João Gilberto Maksoud Filho

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Pinho-Apezato, Maria Lúcia de

Lesão causada pela isquemia seguida de reperfusão em modelo experimental de transplante de intestino em porcos jovens : avaliação por meio de métodos histológicos, imunoistoquímicos e de biologia molecular / Maria Lúcia de Pinho-Apezato. -- São Paulo, 2010.

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

Orientador: João Gilberto Maksoud Filho.

Descritores: 1.Intestino delgado/transplante 2.Modelos animais 3.Isquemia
4.Reperfusão 5.Interleucina-6 6.Endotelinas 7.Apoptose

USP/FM/DBD-443/10

Estudo desenvolvido no Laboratório de Cirurgia Experimental do Instituto da Criança do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em associação com o Laboratório de Cirurgia Pediátrica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM-30), com a colaboração do Laboratório de Investigação em Patologia Hepática (LIM-14).

O projeto de pesquisa foi aprovado na Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 27/07/2006 (protocolo nº 561/06).

Ao meu pai, David, pela razão (com saudades sem fim).

À minha mãe, Selma, pelo coração.

Ao meu marido, Marcelo, pelo companheirismo e apoio.

Aos meus filhos, Catarina e David, sentido da vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Gilberto Maksoud, pelo estímulo e empenho para a criação do modelo experimental para o treinamento da equipe e pelo exemplo de obstinação.

Ao Dr. João Gilberto Maksoud Filho, meu orientador, pelas valiosas sugestões e precisas orientações no desenvolvimento desta tese, além da infalível presença durante a realização das cirurgias.

Ao Prof. Dr. Uenis Tannuri, professor titular da Disciplina de Cirurgia Pediátrica e Transplante Hepático do Instituto da Criança, e chefe do Laboratório de Cirurgia Pediátrica (LIM 30), pela participação direta na execução e pelo incentivo à conclusão do projeto.

A Dra. Emilia Aparecida Valinetti, cuja dedicação e compromisso com a excelência foram fundamentais para a bem sucedida realização dos experimentos.

A Dra. Maria Mercês Santos, Dra. Ana Cristina Aoun Tannuri e Dr. Rodrigo Romão pela participação ativa na execução dos experimentos.

Ao Dr. Evandro Sobroza de Mello, pela orientação na manipulação dos materiais para os estudos histológico e imunoistoquímico e pela avaliação histológica das amostras.

Ao Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva, pelo auxílio na avaliação imunoistoquímica e no processamento das imagens.

A Maria Cecília Mendonça Coelho, pela extrema competência e dedicação na realização dos estudos envolvendo biologia molecular.

A Suely Nonogaki, pesquisadora científica do Instituto Adolfo Lutz e colaboradora do Centro de Pesquisa do Hospital A.C.Camargo, pelos impressionantes entusiasmo e zelo na execução dos métodos imunoistoquímicos.

Ao perfusionista Raimundo Renato Nunes Guimarães, pela presença certa e pela disposição invejável.

À enfermeira Ana Maria de Andrade, pelo seu empenho em melhorar as condições de trabalho e na solução dos problemas encontrados durante a execução do projeto.

A toda a equipe de enfermagem do Serviço de Cirurgia Pediátrica do Instituto da Criança da FMUSP, pelo auxílio no cuidado com os animais e na realização dos procedimentos.

A Amanda Aguiar, aprimoranda do Programa de Aperfeiçoamento Profissional em Imunoistoquímica do Instituto Adolfo Lutz, pelo preparo das lâminas para a análise imunoistoquímica.

A todos os residentes e ex-residentes do Serviço de Cirurgia Pediátrica, nominalmente, Dr. Norio Matsumura, Dr. Fabio Barros, Dr. Luiz Roberto Schlaich Ricardi e Dr. Antônio José Gonçalves Leal que auxiliaram nos cuidados dos animais no período pós-operatório.

A todos da Disciplina de Cirurgia Pediátrica do Instituto da Criança, Dr. Arthur Loghetti Mathias, Prof. Dr. Manoel Carlos Prieto Velhote, Dr. Ali Abdul Rahman Ayoub, Dr. Marcos Marques da Silva, Dr. Nelson Elias Mendes Gibelli, todos ativos participantes na minha formação na especialidade.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Quadros

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	20
3	MÉTODOS	22
3.1	Elaboração do modelo experimental (projeto piloto)	23
3.2	Materiais e métodos	35
3.2.1	Análise histológica	37
3.2.2	Análise imunoistoquímica	38
3.2.2.1	Mieloperoxidase	39
3.2.2.2	Quantificação de células MPO positivas	41
3.2.3	Análise histoquímica	41
3.2.3.1	TUNEL	41
3.2.3.2	Quantificação das células epiteliais em apoptose (TUNEL positivas)	44
3.2.4	Análise por biologia molecular	46
3.2.4.1	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	47
3.2.4.2	Análise semiquantitativa dos produtos da reação em cadeia da polimerase	49
3.2.4	Análise Estatística	50
4	RESULTADOS	51
4.1	Avaliação histológica	53
4.1.1	Hematoxilina-eosina	53
4.2	Análise Imunoistoquímica	55
4.2.1	<i>Mieloperoxidase</i>	55
4.3	Análise histoquímica	59
4.3.1	Contagem das células epiteliais em apoptose pelo método TUNEL	59

4.4	Estudos Moleculares	62
4.4.1	Expressão do gene da pré-pró-endotelina-1	62
4.3.2	Expressão do gene da IL-6	65
4.3.3	Expressão do gene Bak	68
4.3.4	Expressão do gene Bcl-XL	69
5	DISCUSSÃO	72
6	CONCLUSÕES	84
7	ANEXOS	87
8	REFERÊNCIAS	101

Lista de Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucléico
ARN	Ácido ribonucléico
ATP	Adenosina trifosfato
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CPDA	<i>Citrate Phosphate dextrose adenosine</i>
DAB	<i>Diaminobenzidine tetrahydrochloride</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMSO	Dimetilssulfóxido
ET	Endotelina
ET _R	Receptor de endotelina
EUA	Estados Unidos da América
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HC	Hospital das Clínicas
IL	Interleucina
INF	Interferon
LIR	Lesão causada pela isquemia seguida de reperfusão
MPO	Mieloperoxidase
NP	Nutrição parenteral
OPTN	<i>Organ Procurement and Transplantation Network</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PO	Pós-operatório
PTFE	Politetrafluoretileno
PVC	Pressão venosa central
RCA	Rejeição celular aguda
TdT	Transferase deoxinucleotidil Terminal
TI	Transplante de Intestino
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>
TUNEL	<i>Terminal-deoxynucleotidyl-transferase-mediated digoxigenin-Uracil-triphosphate-FITC Nick End Labeling</i>
UW	Universidade de Wisconsin

Lista de Símbolos

%	por cento
<	menor
>	maior
®	marca registrada comercial
°C	graus Celsius
cm H ₂ O	centímetro de água
cm ²	centímetro quadrado
Fr	French (escala à francesa ou de Charrière)
g	grama
kg	quilograma
mg	miligrama
mL	mililitro
mM	milimolar
mm Hg	milímetro de mercúrio
mmol	milimol
pmol	picomol
rpm	rotação por minuto
U	unidade
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
µm ²	micrômetro quadrado

Lista de Figuras

- Figura 1. Quimera representada em prato de cerca de 350-340 AC. Departamento de Antiguidades Gregas, Etruscas e Romanas, Museu do Louvre, Paris 3
- Figura 2. Esquema representando os mecanismos envolvidos na apoptose, com suas duas vias de ativação: a via extrínseca e a via intrínseca. A família de genes *Bcl-2* está envolvida na apoptose desencadeada pela via intrínseca 18
- Figura 3. Fotografia do aspecto intraoperatório da cirurgia do doador de intestino 25
- Figura 4. Fotografia do aspecto intraoperatório das anastomoses vasculares (venosa à esquerda da figura e arterial, à direita) imediatamente antes da reperfusão . 29
- Figura 5. Fotografia do aspecto intraoperatório das alças intestinais. 30
- Figura 6. Organograma apresentando esquema do modelo experimental 36
- Figura 7. Alterações histológicas detectadas pela coloração de HE 38
- Figura 8. Fotomicrografia da mucosa intestinal corada pelo método de TUNEL, com aumento de 200x 45
- Figura 9. Fotomicrografias de microscopia óptica com aumento 100x, com coloração HE. 54
- Figura 10. Detalhes de fotomicrografias da mucosa intestinal à microscopia óptica, com aumento de 100x 55
- Figura 11. Fotomicrografia digitalizada para contagem de células marcadas pela técnica de imunistoquímica 56
- Figura 12. Distribuição da contagem de células MPO positivas no grupo 1 (90 minutos de isquemia), nos tempos basal, 30 minutos após reperfusão e três dias após reperfusão 58
- Figura 13. Distribuição da contagem de células MPO positivas no grupo 2 (180 minutos de isquemia), nos tempos basal, 30 minutos após reperfusão e três dias após reperfusão 58

Figura 14. Evolução temporal do número de células epiteliais em apoptose no grupo 1 (90 minutos de isquemia)	61
Figura 15. Evolução temporal do número de células epiteliais em apoptose no grupo 2 (180 minutos de isquemia)	61
Figura 16. Valores das densidades relativas de bandas do gene da pré-pró-endotelina-1 no grupo 1	63
Figura 17. Valores das densidades relativas de bandas do gene da pré-pró-endotelina-1 no grupo 2	64
Figura 18. Valores das densidades relativas de bandas do gene da IL-6 no grupo 1	66
Figura 19. Valores das densidades relativas de bandas do gene da IL-6 no grupo 2	67
Figura 20. Valores das densidades relativas de bandas do gene anti-apoptótico <i>Bcl-XL</i> no grupo 1 (90 minutos de isquemia)	70
Figura 21. Valores das densidades relativas de bandas do gene anti-apoptótico <i>Bcl-XL</i> no grupo 2 (180 minutos de isquemia)	71

Lista de Tabelas

- Tabela 1. Comparação da contagem de células positivas para MPO entre os grupos 1 e 2, nos diferentes tempos (basal, 30 minutos e três dias após reperfusão). Nenhuma diferença significativa foi encontrada 57
- Tabela 2. Comparação da contagem de células em apoptose marcadas pelo método TUNEL entre os grupos 1 e 2, nos diferentes tempos (basal, 30 minutos e três dias após reperfusão). Nenhuma diferença significativa foi encontrada 60
- Tabela 3. Comparação entre a expressão do gene da pré-pró-endotelina-1 entre os grupos 1 e 2, nos diferentes tempos (basal, 30 minutos e três dias após reperfusão) 62
- Tabela 4. Comparação entre a expressão do gene da IL-6 entre os grupos 1 e 2, nos diferentes tempos (basal, 30 minutos e três dias após reperfusão) 65
- Tabela 5. Comparação entre a expressão do gene *Bak* entre os grupos 1 e 2, nos diferentes tempos (basal, 30 minutos e três dias após reperfusão) 68
- Tabela 6. Comparação entre a expressão do gene Bak entre os grupos 1 e 2, nos diferentes tempos (basal, 30 minutos e três dias após reperfusão) 69

Lista de Quadros

Quadro 1. Anticorpos anti-mieloperoxidase utilizados no modelo experimental	39
Quadro 2. Solução tampão utilizada na reação de TUNEL	43
Quadro 3. Solução <i>Stop/wash</i> utilizada na reação de TUNEL	43
Quadro 4. Quadro demonstrando os as sequências de pares de bases, o tamanho, a temperatura ótima de associação e o número de ciclos necessário para amplificação dos genes	48

Resumo

Pinho-Apezato ML. *Lesão causada pela isquemia seguida de reperfusão em modelo experimental de transplante de intestino em porcos jovens: avaliação por meio de métodos histológicos, imunoistoquímicos e de biologia molecular* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 111p.

INTRODUÇÃO: O transplante de intestino (TI) estabeleceu-se como tratamento para pacientes com falência intestinal e complicações da nutrição parenteral. Entretanto, sepse continua sendo a principal causa de mortalidade. A lesão causada pela isquemia seguida de reperfusão (LIR) é apontada como um dos fatores de ruptura da barreira mucosa intestinal, com conseqüente translocação bacteriana e sepse, seja precocemente, por lesão epitelial direta, seja mais tardiamente pela sua associação com o desenvolvimento da rejeição celular aguda. Criou-se um modelo de TI em porcos jovens com a finalidade de estudar a LIR e seus efeitos no epitélio intestinal. **MÉTODOS:** Para a padronização do modelo, foram realizados 25 procedimentos, tendo sido testados os tamanhos dos animais, as soluções de preservação, o tipo de drenagem venosa, o tipo de reconstrução intestinal e o tempo de duração do experimento. Na pesquisa propriamente dita, 20 porcos jovens foram submetidos a TI ortotópico. Dois grupos foram determinados conforme o tempo de isquemia fria a que foi submetido o intestino: *grupo 1* (n=12) – 90 minutos (min) e *grupo 2* (n=8) – 180 min. O procedimento foi realizado sob técnica asséptica e as anastomoses vasculares realizadas entre a aorta do doador e a aorta infra-renal do receptor e a veia porta do doador e a veia cava inferior do receptor. O trânsito intestinal foi reconstruído através de anastomoses entre o jejuno proximal do doador e do receptor e o íleo terminal do doador e do receptor. A solução de preservação utilizada foi Euro Collins. Não foi administrada medicação imunossupressora, exceto pela metilprednisolona (20mg/kg) no momento da reperfusão. Fragmentos de intestino foram obtidos: 1 – no momento da laparotomia do doador, o fragmento basal, considerado controle, 2 – 30 min após a reperfusão e 3 – 3 dias após o transplante. Os fragmentos assim obtidos foram submetidos a: 1 – análise histológica com coloração de hematoxilina-eosina (HE), 2 – análise imunoistoquímica para a detecção de infiltração da mucosa por neutrófilos (marcados pelos grânulos ricos em mieloperoxidase – MPO), 3 – análise histoquímica para quantificação de células epiteliais em apoptose pelo método TUNEL, 4 – análise da expressão dos genes da endotelina-1 (ET-1) e da interleucina-6 (IL-6), do gene antiapoptótico *Bcl-XL* e do gene pró-apoptótico *Bak*. A análise estatística foi realizada utilizando-se o teste de Mann-Whitney na comparação entre os grupos e, na análise da evolução temporal da LIR em cada grupo, o teste de Friedman seguido do teste *post hoc* de Dunn quando detectada diferença estatisticamente significativa. **RESULTADOS:** Não foram encontradas diferenças entre os grupos quanto às alterações histológicas estudadas. O grau de infiltração da mucosa por neutrófilos elevou-se significativamente nos dois grupos 30 min após perfusão, tendo persistido elevado 3 dias após o TI somente no grupo 2. O número de células epiteliais em apoptose detectadas pelo método TUNEL sofreu incremento significativo apenas no grupo 1, 3 dias após o procedimento. As duas citocinas estudadas, IL-6 e ET-1 mostraram elevação significativa 30 minutos após a reperfusão, tendo retornado aos níveis basais 3 dias após a cirurgia em ambos

os grupos. Detectou-se redução significativa da expressão do *Bcl-XL* somente no grupo 1, 3 dias após o TI. CONCLUSÕES: As citocinas estudadas estão envolvidas no processo de LIR nas fases iniciais do TI. Ocorre diminuição da expressão de gene anti-apoptótico e aumento do número de células em processo de morte celular de maneira mais intensa no grupo submetido a menor tempo de isquemia.

Descritores: 1.Intestino delgado/transplante 2.Modelos animais 3.Isquemia
4.Reperfusão 5.Interleucina-6 6.Endotelinas 7.Apoptose

Summary

Pinho-Apezato ML. *Experimental model of intestinal transplantation in pigs: evaluation of the ischemia reperfusion injury by means of histological, and immunohistochemical methods and molecular biology* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2010. 111p.

INTRODUCTION: Intestinal transplantation (ITx) has become an accepted mode of treatment of intestinal failure patients who develop parenteral nutrition-related complications. Overall outcomes have dramatically improved but sepsis remains the leading cause of mortality. Ischemia-reperfusion injury (IRI) has been related to the development of sepsis due either to direct mucosal damage or to increased risk of acute cellular rejection. An experimental ITx model has been idealized in order to better characterize IRI-associated mucosal damage. **METHOD:** 25 procedures involving 75 outbred pigs were necessary to standardize the procedure. Weight of the animals, venous drainage, intestinal transit reconstruction as well as the time period the animals should be maintained alive were evaluated. Orthotopic ITx was performed in 20 hybrid pigs. Two groups were assigned according to cold ischemia time (CI): *group 1* (n=12) – 90 minutes (min), *group 2* (n=8) – 180 min. The procedure was performed under aseptic technique and portal drainage was adopted as standard. Intestinal transit reconstruction involved the performance of termino-terminal anastomosis between donor and recipient jejunum and donor and recipient terminal ileum. Euro-Collins was used as preservation solution. 20mg/kg of methylprednisolone was administered at reperfusion and no other immunosuppressive drug has been employed. Specimens were collected from the donor at laparotomy, and from the receptor, 30 min, and 3 days after reperfusion. Mucosal damage was assigned by histological evaluation with hematoxylin-eosin dye. Neutrophilic infiltration was quantified using myeloperoxidase (MPO) immunohistochemical assay and epithelial cell apoptosis was also assigned by means of TUNEL assay. Molecular biology involved the quantification of the expression of the IL-6, ET-1, *Bak*, and *Bcl-XL* genes. **RESULTS:** No statistical difference was detected between the groups as far as plain histological evaluation is regarded. Neutrophilic infiltration increased in a similar fashion in both groups, but lasted longer in group 2. Apoptosis detected by TUNEL showed significant increase in group 1, 3 days after surgery. Anti-apoptotic gene *Bcl-XL* had its expression decreased in group 1, in 3 days as well. Endothelin-1 and IL-6 genes expression increased 30 min after the procedure and had already returned to baseline 3 d after surgery. **CONCLUSION:** IL-6 and ET-1 are involved precociously in the development of intestinal IRI. Neutrophilic infiltration lasted longer in the group submitted to longer CI. Although there were no significant differences between the groups, significant increase in the number of apoptotic epithelial cells 3 days after reperfusion could be detected in animals.

Descriptors: 1.Small bowel/transplantation 2.Animal models 3.Ischemia
4.Reperfusion 5.Interleukin-6 6.Endothelins 7.Apoptosis

1 Introdução

História

O transplante de órgãos desperta interesse desde a antiguidade. O tema foi alvo de curiosas descrições envolvendo conceitos relacionados ao transplante de órgãos e tecidos, que podem ser encontradas em textos mitológicos, religiosos e históricos¹. Muito conhecida da mitologia grega, a quimera é um animal imaginário formado por segmentos de vários animais reais: corpo de leoa, rabo que termina em uma cabeça de serpente, e uma cabeça de bode emergindo do dorso, no centro da coluna vertebral (Figura 1). Na Bíblia, vários exemplos podem ser encontrados associados à idéia de transplante de órgãos, ou auto-transplante: Jesus Cristo reconstitui a orelha de um servo ferido na guerra; São Pedro reimplanta as mamas de Santa Ágata, vítima de tortura; e São Marcos reimplanta a mão de um soldado ferido em batalha. Registros pré-históricos, da Era do Bronze, descrevem transplantes de estruturas como osso, dentes e pele. O transplante de dentes é descrito em várias culturas, entre as quais a egípcia, a grega e a romana.



Figura 1. Quimera representada em prato de cerca de 350-340 AC. Departamento de Antiguidades Gregas, Etruscas e Romanas, Museu do Louvre, Paris

Lillehei foi o pioneiro na realização do transplante de intestino (TI) em animais de laboratório e descreveu a técnica em 1959. Os animais morriam devido à rejeição, mas a capacidade absorptiva do intestino transplantado pode ser demonstrada antes do óbito^{2,3,4}. Em 1964, Deterling e Fisher, realizaram TI em duas crianças, que faleceram, respectivamente, 12 horas e dois dias após o transplante. Okumura realizou o terceiro e quarto TI em humanos, em 1968 e 1969, ambos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP).

O primeiro, em uma mulher de 34 anos, com trombose de artéria mesentérica e o segundo, numa criança de 12 anos que perdeu o intestino devido à necrose maciça secundária a volvo do intestino médio. No primeiro caso, a paciente faleceu por falência de múltiplos órgãos pouco tempo após a retirada do enxerto, que apresentava necrose extensa secundária a rejeição celular aguda (RCA). No segundo, a criança faleceu no quinto dia de pós-operatório (PO) por insuficiência de múltiplos órgãos e tecidos e a avaliação do explante demonstrou RCA^{5,6}. Essas foram as primeiras constatações de que a RCA representa um dos principais obstáculos a ser vencido no TI.

Os primeiros casos com sobrevida um pouco mais prolongada, em torno de 100 dias, foram descritos por Starzl e Williams em 1989, em duas crianças, que receberam transplante combinado fígado-intestino e, apesar de atingirem independência da nutrição parenteral, faleceram por linfoma pós-transplante^{7,8}. O primeiro TI isolado com sobrevida no longo prazo foi realizado em 1989 por um grupo parisiense, do Hôpital Necker-Enfants Malades, ainda com a utilização de imunossupressão baseada no uso da ciclosporina⁹.

Apesar do entusiasmo inicial, os índices de morbidade e mortalidade, associados ao grande desenvolvimento da nutrição parenteral (NP), fizeram com que o TI não fosse reconhecido como opção terapêutica adequada para o tratamento da falência intestinal. O TI provoca estímulo imunogênico muito mais intenso que os demais órgãos quando transplantados. Cerca de 80 % das células imunológicas habitam normalmente o intestino e, após o transplante, o enxerto é repovoado por células do sistema imunológico do receptor, enquanto que as células epiteliais mantêm o genótipo do doador^{10,11,12}. Além disso, o intestino,

diferentemente do que ocorre nos demais órgãos sólidos transplantados, não é estéril e depende da barreira mecânica da mucosa e de mecanismos imunológicos, tais como, a produção de peptídeos antimicrobianos para se proteger contra a invasão bacteriana¹³. Com isso, a despeito do grande desenvolvimento atingido pelo transplante de órgãos sólidos como o coração e o fígado a partir do emprego da ciclosporina A; esta não se mostrou tão eficaz no TI. Foi somente com a utilização do tacrolimus (FK506), no início da década de 90, que o TI passou a ter resultados mais satisfatórios¹⁴.

Outros fatores de fundamental importância no desenvolvimento do TI foram o aprimoramento da técnica cirúrgica, a detecção e o tratamento precoces da RCA, a prevenção e o controle mais adequados de infecções virais, tais como, a do vírus Epstein-Barr, do citomegalovírus e do adenovírus, a utilização de agentes indutores nos protocolos de imunossupressão, como os inibidores da interleucina-2 (IL-2), e, notadamente, a melhor compreensão da fisiopatologia do TI.

TI clínico – estado atual

Segundo a Rede Norte-Americana de Captação e Transplante de Órgãos (OPTN – *Organ Procurement and Transplantation Network*), no período de 01 de janeiro de 2009 a 30 de junho de 2010, 2961 pacientes menores de 18 anos receberam transplante de órgão sólido, respondendo por 7 % de todos os transplantes realizados nos Estados Unidos da América (EUA). No caso do TI, as crianças (menores de 18 anos) responderam por 49 % de todos os casos realizados.

O TI está indicado em pacientes com falência intestinal e complicações relacionadas à NP: lesão hepática, episódios de infecção relacionados ao cateter,

perda (trombose) de acessos venosos centrais e em crianças com inadequado ganho pondero-estatural. A definição de falência intestinal é funcional, ou seja, consiste na incapacidade do intestino em promover a nutrição e a hidratação adequadas, independentemente do comprimento do intestino remanescente. Em 68 % dos casos, as indicações de TI em crianças, no entanto, estão associadas a ressecções cirúrgicas extensas que resultam em intestino curto¹⁴. As doenças mais comuns são gastrosquise (24 %), enterocolite necrosante (16 %), volvo do intestino médio (15 %) e atresia intestinal (9 %)¹⁵. Algumas alterações funcionais do intestino, como a pseudo-obstrução intestinal e a aganglionose cólica total, podem, também, levar a uma inadequação da capacidade absorptiva do intestino, tornando necessário o TI. Alterações de mucosa que prejudicam a capacidade do intestino de absorver nutrientes são bastante raras, mas devem, também, ser lembradas: doença da inclusão dos microvilos, associada a mutações na miosina motora tipo Vb e enteropatia *tufting* ou displasia epitelial intestinal, associada a mutações na molécula de adesão da célula epitelial. Ambas caracterizam-se por diarreia secretora de apresentação logo após o nascimento, evoluindo com perda de líquidos e eletrólitos, progredindo para desidratação grave e acidose metabólica.

Sob a classificação de TI, incluem-se o transplante de intestino isolado, o transplante combinado fígado-intestino e o transplante multivisceral, em que outros órgãos, como o estômago, o duodeno e/ou o pâncreas são transplantados concomitantemente.

A revisão da experiência mundial, avaliando os resultados obtidos em cerca de 2000 casos, revela resultados muito animadores nos últimos cinco anos. Nesse período, a sobrevida em um ano está próxima a 80 % e em três anos, a 60 %. Nos

centros onde são realizados um maior número de TI, os resultados são ainda melhores: sobrevida em três anos de 70 a 84 %^{16,17,18}.

A principal causa de óbito permanece a mesma desde os relatos iniciais: sepse em 50 % dos casos. A infecção está associada, principalmente, ao uso intensivo de drogas imunossupressoras e à lesão da mucosa intestinal decorrente de RCA, doença linfoproliferativa e/ou lesão ocasionada pela isquemia seguida de reperfusão (LIR). A lesão isquêmica, agravada pela agressão causada pela reperfusão, leva à perda da função de barreira da mucosa intestinal, permitindo a ocorrência de translocação bacteriana, que promove a exacerbação da resposta inflamatória, além de colocar o paciente em risco de desenvolver infecções potencialmente graves. Os sinais inflamatórios envolvidos na LIR têm a capacidade de aumentar a expressão de antígenos do complexo de histocompatibilidade e consequente ativação imunológica e maior risco de RCA. A rejeição agrava ainda mais a lesão da mucosa, o que aumenta o risco de translocação bacteriana e um ciclo vicioso de lesão da mucosa, inflamação, ativação imunológica e translocação bacteriana se instala e pode ser consequência da LIR.

A grande sensibilidade da mucosa intestinal à isquemia somada à lesão causada pela reperfusão^{19,20,21} e a antigenicidade do intestino são grandes responsáveis pela dificuldade em se melhorar os resultados do transplante.

Fica, deste modo, evidente que a infecção, secundária diretamente à LIR ou à RCA que, por sua vez, também está relacionada à LIR, é importante fator de insucesso, havendo, assim, todo interesse em evitar ou minimizar seu desencadeamento

TI e a LIR

Foram descritas várias razões para a significativa sensibilidade do intestino à lesão causada pela isquemia. A reperfusão promove dano ainda maior às células já submetidas à agressão pela isquemia. Os enterócitos localizados no ápice dos vilos são os mais sensíveis aos efeitos da isquemia, sendo que a sua localização terminal na distribuição da arteríola central foi apontada como causa dessa maior vulnerabilidade. Entretanto, estudos mais recentes apontam o grau de diferenciação do enterócito do ápice do vilos como sendo o principal responsável pela labilidade do enterócito frente à agressão isquêmica^{22,23}. O intestino requer alto fluxo sanguíneo para manter o grande consumo de oxigênio (O₂) que ocorre, principalmente, na mucosa intestinal, sendo esta responsável por cerca de 20 % do consumo total de O₂ do organismo em repouso²⁴.

A arquitetura dos capilares do vilos intestinal é bastante particular e caracteriza-se por um mecanismo de contra-corrente de liberação de O₂ entre a arteríola e a vênula, provocando efeito “*shunt*” que, sob condições fisiológicas, não compromete o metabolismo normal dos enterócitos. No entanto, sob condições de hipoxia, os enterócitos, e em maior grau aqueles do ápice do vilos, sofrem mais precoce e intensamente com a falta de O₂^{25,26}.

A hipoxia inicial leva a depleção de ATP, seguida por alteração das concentrações do sódio e do cálcio intracelular e ativação de enzimas citotóxicas, tais como proteases e fosfolipases. A reperfusão, por sua vez, gera radicais livres que potencializam a lesão celular. Como consequência, ocorre liberação de mediadores inflamatórios, dano endotelial e alteração da microcirculação²⁷⁻³⁰.

A lesão da mucosa causada pela isquemia favorece a translocação bacteriana, a inflamação e a sepse. Além disso, ela vem sendo associada, no caso do TI, ao desenvolvimento de rejeição celular aguda e crônica³¹.

Diversos pesquisadores, de praticamente todas as áreas do conhecimento médico têm estudado extensamente a LIR. Minimizar as consequências da isquemia é de grande interesse, por exemplo, nos casos de infarto agudo do miocárdio, choque hipovolêmico no paciente politraumatizado e em pacientes vitimados por acidentes vasculares cerebrais.

Duas fases distintas da LIR foram descritas:

1. a primeira fase, inicial, que ocorre antes de duas horas após a reperfusão, é caracterizada pelo estresse oxidativo, com a produção de radicais livres de oxigênio, que causam dano tecidual diretamente;
2. a fase tardia, seis a 48 horas após a reperfusão, corresponde a uma reação inflamatória mal controlada, mediada por neutrófilos, que lesam as células parenquimatosas, pelo menos em parte pela liberação de radicais livres de oxigênio³².

Várias vias metabólicas foram implicadas no desenvolvimento da lesão pós-isquêmica, tornando-se potenciais alvos de intervenção. Desde a descoberta da vasodilatação dependente do endotélio, em 1980³³, ele vem sendo reconhecido como unidade funcional importante na regulação do tônus da musculatura lisa vascular.

O completo entendimento do envolvimento das citocinas na LIR é pré-requisito para que adequadas intervenções possam ser realizadas. A IL-1 e o fator de necrose tumoral (TNF)- α são classicamente considerados mediadores pró-

inflamatórios na LIR. Por outro lado, citocinas como a IL-10 e a IL-4 parecem estar associadas à atenuação do processo inflamatório³⁴.

IL-6 e transplantes

A IL-6 foi descoberta e reproduzida em 1986, é uma citocina composta por 184 aminoácidos, intimamente relacionada à resposta inflamatória. Ela é produzida por células imunológicas: monócitos, macrófagos e linfócitos e, também, por vários outros tipos celulares como o endotélio e o enterócito. A sua produção é estimulada por várias substâncias, como IL-1, TNF, fator de ativação de plaquetas (PAF), lipopolissacárides e metabólitos reativos de oxigênio. Dentre as principais ações da IL-6 estão a maturação e diferenciação de linfócitos B e estimulação da proliferação e diferenciação dos linfócitos T. A IL-6 inibe a capacidade de supressão dos linfócitos T regulatórios, e, em conjunto com o TNF- β , induz a polarização das células T CD4⁺, para linhagem T_{helper17}, que está associada ao desenvolvimento de autoimunidade^{35,36}.

Seu receptor é composto por duas proteínas: uma, de 80kDa, funciona como o receptor propriamente dito e a segunda, de 130kDa, funciona como um transdutor dos sinais. A interação entre a IL-6 e seu receptor envolve duas moléculas de cada e é somente a fração de 130kDa (gp130) dimerizada que tem a capacidade de transmitir o sinal. Existem, também, receptores solúveis, que têm efeito agonista quando em complexo com a IL-6³⁷. Células do endotélio intestinal, macrófagos e linfócitos T_{helper} expressam receptores para IL-6.

Em relação à reação inflamatória, a ação dessa IL ainda é controversa. Em geral, ela é considerada pró-inflamatória, uma vez que está elevada, nos estádios iniciais das respostas inflamatórias, juntamente com outras citocinas como o TNF α ,

IL-1 e o interferon- γ ³⁸. Ela é reconhecida como importante mediador da disfunção intestinal na doença inflamatória intestinal e a sua neutralização por meio de anticorpos melhora a função intestinal e os sintomas³⁹.

Existem estudos que associam essa citocina com exacerbação de resposta inflamatória e piora de prognóstico em casos de sepse, mas existem outros que lhe atribuem certa atividade antiinflamatória nessa mesma situação. Alguns modelos experimentais evidenciaram uma exacerbação da resposta inflamatória em pancreatite induzida em ratos geneticamente modificados para não expressarem IL-6 em comparação com ratos normais^{40,41}. Por outro lado, num modelo de choque hemorrágico em ratos, nos animais que não expressam IL-6, a resposta inflamatória pulmonar e a lesão intestinal secundária foram menos intensas que nos ratos controle⁴². Níveis séricos elevados de IL-6 são detectados após procedimentos cirúrgicos, traumas ou queimaduras^{43,44} e, em neonatos, seus níveis estão diretamente relacionados a risco significativamente aumentado de morbidade⁴⁵. Também em neonatos, naqueles que desenvolvem sepse ou resposta inflamatória sistêmica, foi detectada produção aumentada de IL-6 pelos enterócitos. Essa produção é ainda intensificada por bactérias, endotoxinas e outras citocinas⁴⁶. Pacientes em sepse, também, demonstram níveis elevados de IL-6^{47,48}.

A IL-6 está envolvida, portanto, em inúmeros processos patológicos acompanhados de resposta inflamatória.

Não está ainda esclarecido se a IL-6 circulante é agente ou somente um marcador de gravidade da doença. Alguns estudos experimentais de TI que propõem medidas para minimizar a LIR, levam em consideração os níveis séricos de IL-6 como um dos marcadores do grau da lesão⁴⁹.

Alguns trabalhos sugerem que a IL-6 possa proteger os tecidos da LIR. Estudo publicado por Murase et al., em 2003, demonstrou que a administração exógena de IL-6, em modelo experimental de TI em ratos, levou a diminuição da intensidade da LIR, menor infiltração por neutrófilos tanto no intestino como em órgãos distantes como o pulmão e melhora do padrão circulatório do intestino, concluindo, desta forma, que a IL-6 tem papel protetor contra a LIR do intestino⁵⁰. Outro trabalho envolvendo a administração exógena de IL-6 a ratos submetidos à isquemia de células da retina demonstrou diminuição da morte de células ganglionares dessa região nos animais que receberam a IL⁵¹. Um modelo *in vitro* de barreira hematoencefálica demonstrou produção de IL-6 pelas células da glia em resposta à interrupção do fluxo sem prejuízo do fornecimento de oxigênio e energia (glicose). A elevação na produção de IL-6 mostrou-se estar correlacionada à liberação de óxido nítrico⁵².

Em resumo, os estudos conflitantes sobre seus efeitos deletérios ou benéficos apenas confirmam a importância da IL-6 em diversos fenômenos fisiológicos e de doença.

ET e transplantes

O endotélio deixou de ser considerado uma barreira inerte aos elementos do sangue. Ele forma uma camada que separa o sangue e os tecidos subendoteliais, que têm potencial trombogênico, e regula o tônus, o crescimento, a hemostasia e a inflamação no sistema circulatório.

As endotelinas (ET) constituem uma família de peptídeos produzidos em uma ampla gama de tecidos e que modulam, por exemplo, o tônus vasomotor, a

proliferação celular e a síntese hormonal⁵³. Sua estrutura, que contém múltiplas pontes de disulfeto, é comum a um grupo de toxinas peptídicas que atuam em canais de membrana, como o veneno da abelha e a neurotoxina do veneno do escorpião⁵⁴. Ela deriva de um precursor inativo, a pré-pró-endotelina, composta por uma sequência de 212 aminoácidos, que, após ser processado por proteases em peptídeos também inativos, constituídos de 38 aminoácidos, são chamados pró-endotelinas. Cada uma das pró-endotelinas (pró-ET-1, pró-ET-2 ou pró-ET-3) é clivada por metaloproteinases – enzimas conversoras da endotelina – associadas à membrana celular, originando o peptídeo ativo ET⁵³. Existem três tipos específicos de receptores de ET, mas somente dois (ET_{R-A} e ET_{R-B}) foram identificados em humanos. Esses receptores estão localizados em vários tipos celulares e de órgãos. O ET_{R-A} tem maior afinidade está, principalmente, localizado no músculo liso vascular e media a vasoconstrição e a proliferação de células endoteliais e musculares⁵⁵.

A ET-1, a principal isoforma da endotelina, é um peptídeo vasoativo composto de 21 aminoácidos, produzido principalmente pelas células endoteliais, e liberado na parede do vaso, agindo de forma parácrina nas células musculares, promovendo a vasoconstrição. A sua expressão é modulada por uma grande variedade de estímulos como epinefrina, angiotensina II, cortisol, trombina, citocinas inflamatórias (TNF- α , IL 1 e 2) e hipoxia. Uma das vias mais importantes de eliminação da ET-1 do plasma é por meio dos ET_{R-B} no pulmão⁵⁵.

A resposta inicial à administração intravenosa de ET consiste na redução transitória na resistência vascular. Essa ação é mediada pela liberação de óxido nítrico e prostaciclina pelas células endoteliais estimuladas pelos receptores do tipo B. Segue-se, então, um aumento na resistência vascular mediada por receptores tipo A

na musculatura lisa vascular. Essa fase de vasoconstrição é sustentada e resulta de influxo de cálcio. A ET-1 ativa um canal de cálcio operado por voltagem e dois tipos diferentes de canais de cálcio não seletivos: um que responde a baixas concentrações e o outro que responde somente a altas concentrações de ET⁵⁶. O influxo de cálcio parece ter papel central na apoptose, isto é, na morte celular programada, e a remoção desse íon do espaço extracelular ou o seu tamponamento no meio intracelular podem inibi-la^{57,58}. Vários são os locais da possível ação do cálcio no mecanismo da apoptose: a ativação de enzimas como a endonuclease, proteases, organização da cromatina e regulação de genes⁵⁹.

A ET está, também, envolvida na fisiopatologia da inibição da sintase de óxido nítrico^{60,61}.

Muitas doenças e respostas inadequadas a estímulos nocivos vêm sendo associados à atividade da ET. A isquemia é um estímulo potente para a produção de ET-1 e seu envolvimento na lesão pulmonar causada pela isquemia seguida de reperfusão já foi demonstrado^{62,63,64}. Precocemente, após o transplante pulmonar, os níveis plasmáticos de ET-1 elevam-se pelo menos três vezes e correlacionam-se com o aumento da resistência vascular pulmonar⁶⁴. A adesão dos neutrófilos a células endoteliais bovinas é estimulada pela administração de ET-1, devido à expressão de integrinas na superfície dos neutrófilos⁶⁵. Também, foi descrita a produção aumentada de radicais livres derivados do oxigênio por neutrófilos incubados com ET-1⁶⁶. Em auto-transplante intestinal em cães, a administração de antagonistas do receptor de ET foi relacionado a lesão histológica e alterações hemodinâmicas menos intensas para um mesmo tempo de isquemia^{67,68}. O envolvimento da ET-1 também foi relacionado ao desenvolvimento de doença enxerto contra o hospedeiro em ratos submetidos a TI⁶⁹.

Apoptose, LIR e transplantes

Quando ocorre a interrupção do fluxo sanguíneo para o órgão a ser transplantado, inicia-se uma série de alterações que podem resultar em morte celular. Ocorrem redução nos níveis intracelulares de adenosina tri-fosfato (ATP), transição para metabolismo anaeróbio, acúmulo de produtos do metabolismo anaeróbio e redução do pH intracelular. Essas alterações são, inicialmente, reversíveis mas se a isquemia persistir, a célula morre.

Existe um período no qual as alterações celulares são reversíveis, mas a reperfusão pode levar a novas lesões. Os mecanismos envolvidos na lesão causada pela reperfusão incluem a lesão das membranas de organelas intracelulares, a formação de radicais livres, a agregação linfocitária e a produção de mediadores inflamatórios, a ativação plaquetária, ativação do sistema do sistema do complemento, ativação da cascata pró-apoptótica e a lesão endotelial e a vasoconstrição.

Períodos prolongados de isquemia estão associados a alterações na membrana mitocondrial ocasionando mudanças na sua permeabilidade e provocando, como consequência a elevação da concentração de cálcio e a redução dos níveis de ATP dentro da mitocôndria. Essas alterações ativam um poro não específico na membrana mitocondrial interna que é aberto com o restabelecimento do fluxo sanguíneo e com a normalização do pH. Esse poro permite a migração de proteínas pela membrana mitocondrial, causando edema na organela e por fim, rotura da membrana mitocondrial externa. A liberação das proteínas mitocondriais para o citoplasma celular estimula a apoptose.

A apoptose é um processo de morte celular diferente da necrose. Ela é dependente de energia, pode ser deflagrado em resposta a danos moleculares

mínimos e consiste de uma sequência organizada de eventos desencadeada por sinais específicos. A lesão isquêmica provoca a morte celular por necrose, enquanto a lesão causada pela reperfusão provoca morte celular também por apoptose^{70,71,72}.

Diferentemente do que ocorre na necrose, quando existe, principalmente, edema e lise celular, na apoptose, a membrana celular permanece íntegra durante todo o processo. Inicialmente, o citoplasma sofre condensação e a célula se destaca das células vizinhas. Uma das primeiras características bioquímicas das células em processo de apoptose é a expressão de resíduos de fosfatidil-serina na membrana plasmática. Acredita-se que este fenômeno constitui-se num dos sinais mais precoces da ocorrência de apoptose. A seguir, ocorre condensação da cromatina seguida pela fragmentação nuclear. Durante esta fase, ocorre ativação de endonucleases que resultam na fragmentação ordenada do ácido desoxirribonucléico (ADN) em fragmentos constituídos por 180 a 200 pares de bases. Mais tardiamente, as células fragmentam-se em vesículas ligadas à membrana plasmática, denominadas corpos apoptóticos, que sofrem fagocitose pelas células vizinhas e por macrófagos, sem que ocorra a deflagração de resposta inflamatória.

Existem duas vias de ativação da apoptose: a extrínseca e a intrínseca, que são induzidas por estímulos diferentes, mas com intensa interação. A via intrínseca ou mitocondrial é a via principalmente envolvida no processo desencadeado pela LIR. Neste caso, a célula responde a estresses ambientais com alteração da atividade da mitocôndria, com aumento da permeabilidade da sua membrana. Ocorre a liberação do citocromo-c, uma proteína intramitocondrial, que promove a ativação das caspases (cisteína-proteases), proteínas essenciais para a iniciação da via intrínseca. Ocorre a ativação subsequente de proteases efetoras, incluindo a caspase-3, o que acaba por resultar na morte celular.

Todo o processo é finamente regulado por diversas proteínas, que atuam nas várias fases do desencadeamento da apoptose. Os mecanismos básicos da apoptose, os genes e proteínas que controlam o processo e a sequência de eventos são preservados em todos os organismos multicelulares. Um dos principais exemplos de regulação são os membros da família *Bcl-2*⁷³. Essa família recebeu esse nome por ter sido identificada inicialmente como um oncogene presente em um tipo de linfoma de células B. Ela é composta por mais de 20 membros, em geral presentes no citoplasma celular e na membrana das mitocôndrias, regulando, por meio de um balanço delicado entre seus membros pró e anti-apoptóticos, a permeabilidade da membrana mitocondrial, controlando a saída de proteínas mitocondriais que desencadeiam todo o mecanismo de morte celular.

Sensores de lesão ou estresse, também, pertencentes à família *Bcl-2*, ativam dois efetores: *Bax* e *Bak*. São assim criados canais na membrana mitocondrial, que permitem a saída de proteínas da membrana mitocondrial interna para o citoplasma celular. A síntese de *Bcl-2* e *Bcl-x*, proteínas produzidas por genes anti-apoptóticos, também, pode ser inibida, o que altera o equilíbrio da célula submetida à agressão, ativando-se a cascata das caspases, culminando com a morte celular (Figura 2).

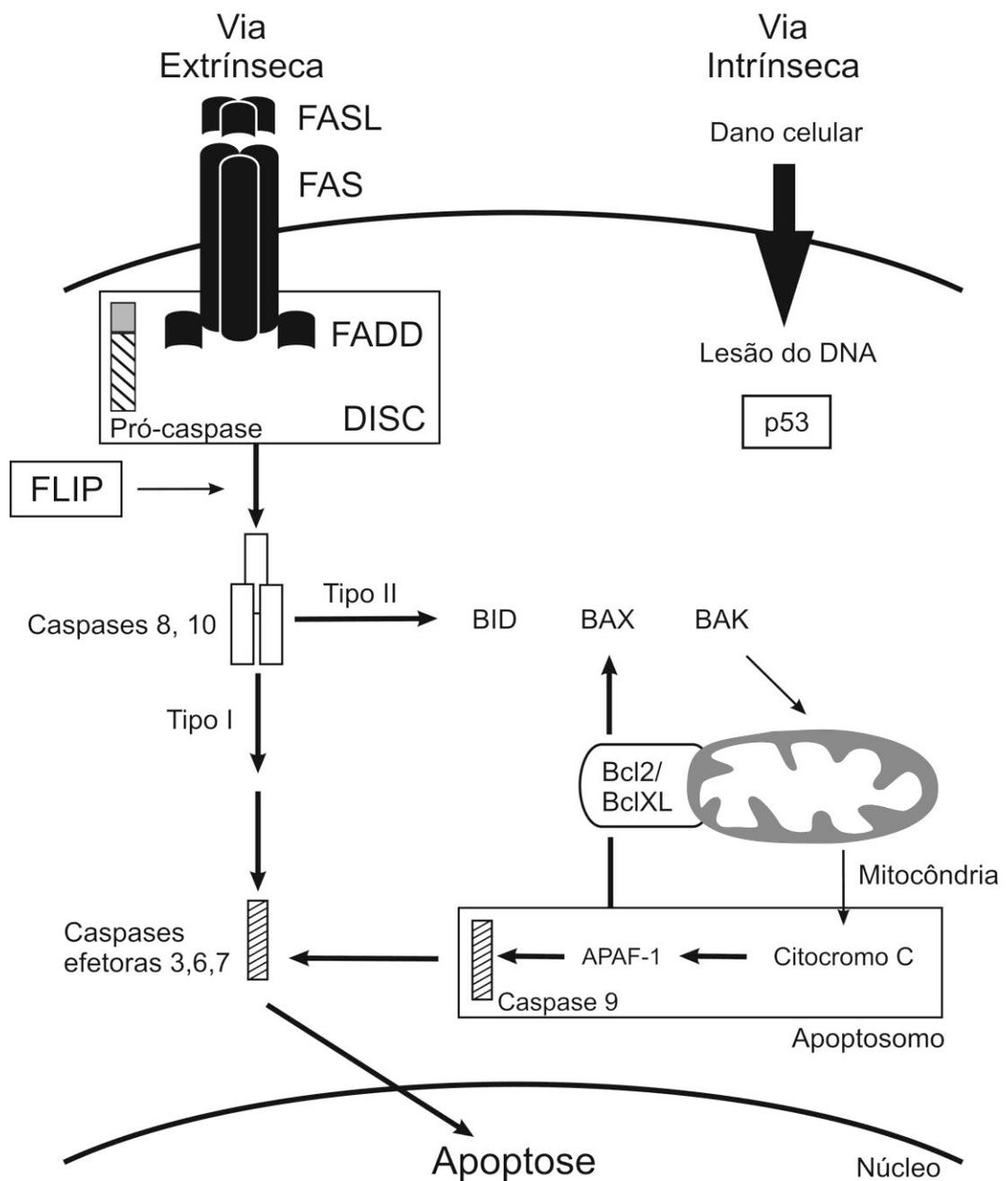


Figura 2. Esquema representando os mecanismos envolvidos na apoptose, com suas duas vias de ativação: a via extrínseca e a via intrínseca. A família de genes *Bcl-2* está envolvida na apoptose desencadeada pela via intrínseca

É importante ressaltar que a apoptose não é somente um mecanismo de proteção contra a lesão do material genético da célula. Ela tem extrema importância no desenvolvimento normal (regressão de caudas vestigiais e das membranas interdigitais), na homeostase dos tecidos e na defesa contra patógenos.

Optou-se por avaliar a expressão e o comportamento IL-6 e da endotelina-1 durante a LIR do intestino delgado transplantado, por ambas representarem possíveis alvos de intervenção para a minimização da lesão imposta ao intestino durante o transplante.

2 Objetivos

Os objetivos do presente estudo foram verificar, nos enxertos intestinais submetidos a dois diferentes períodos de isquemia, no modelo experimental de TI em porcos jovens, até o terceiro dia de PO:

1. Se a avaliação histológica, por meio da coloração de hematoxilina e eosina, utilizando sistema de gradação das lesões mais frequentes consegue identificar as alterações secundárias à LIR;
2. O significado evolutivo da infiltração neutrofílica da mucosa, detectada e quantificada através da técnica de imunoistoquímica;
3. O comportamento das células epiteliais quanto ao desenvolvimento de apoptose, detectada e quantificada por técnica histoquímica;
4. A expressão do gene da ET e seu comportamento evolutivo;
5. A expressão do gene da IL-6 e seu comportamento evolutivo;
6. A expressão dos genes relacionados à apoptose: *Bak* (pró-apoptótico) e *Bcl-XL* (anti-apoptótico) e seu comportamento evolutivo.

3 Métodos

3.1 Elaboração do modelo experimental (projeto piloto)

Na fase inicial, os experimentos foram realizados para a padronização da técnica cirúrgica. Todos os animais foram porcos fêmeas, híbridos das raças Landrace e Large-White. Cada procedimento envolveu três animais: um maior, de 45 dias de vida, com cerca de 30 kg, o doador de sangue; e dois menores, de cerca de 40 dias de vida, com peso em torno de 20 kg. O doador foi sempre de 10 a 15 % menor que o receptor. Foi determinado que o segmento intestinal a ser transplantado seria o intestino delgado, do ligamento de Treitz ao íleo terminal. Nenhum procedimento de descontaminação intestinal foi utilizado. Os animais permaneceram em jejum desde a noite da véspera do procedimento, e foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos, sob anestesia geral, de acordo com as Normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA⁷⁴. Todo o procedimento foi realizado com técnica asséptica.

Trinta minutos antes do início do experimento, cloridrato de cetamina, 10 a 15 mg / kg, maleato de midazolam, 0,1 mg / kg e citrato de fentanila 3 µg / kg, foram administrados por via intramuscular, como medicação pré-anestésica. Após ser atingido o efeito sedativo desejado, o animal foi posicionado na mesa cirúrgica em decúbito dorsal horizontal, e um acesso venoso periférico foi obtido em orelha externa, com cateter do tipo Jelco[®] (co-polímero de tetrafluoroetileno com hexafluor-propileno). Procedeu-se, então, à intubação orotraqueal com cânula 3,5 a 4,5

Fr, com balão. O animal foi ventilado com ventilador Takaoka[®] 600 sendo a anestesia mantida com fentanila, na dose inicial de 3 a 5 µg / kg e atracúrio, 0,9 a 1,0 mg, e as medicações repetidas sempre que necessário.

Iniciou-se o procedimento com o doador do enxerto, o menor animal, que pesou de 15 a 18 kg. Ampicilina, 50 mg / kg e cefotaxima sódica, 50 mg / kg foram administradas por via intravenosa no início do procedimento, antes da incisão da pele. O animal foi submetido à incisão xifo-púbica, e, após realizada a laparotomia, obteve-se amostra representativa do jejuno normal imediatamente após o ligamento de Treitz (fragmento controle ou basal). Esse fragmento foi dividido em duas partes, de 3 cm cada um: o primeiro foi preservado em solução de formaldeído 10% e outro, congelado em nitrogênio líquido e a seguir transferido para geladeira para preservação a -70 °C. Logo após a coleta do material, o intestino delgado do animal foi envolvido em compressa úmida, a fim de minimizar a manipulação das alças e, principalmente, manter o intestino ordenado, impedindo a torção, em especial, dos seus segmentos distais.

Nos primeiros casos, o intestino a ser retirado foi completamente dissecado liberando-se todas as suas aderências com as demais estruturas abdominais e do retroperitônio, seguida da secção do intestino na altura do íleo terminal. Identificou-se e isolou-se, então, a aorta abdominal, procedendo-se à ligadura das artérias renais e do tronco celíaco para evitar desperdício da solução de preservação. Isolou-se a aorta em dois pontos: 1. proximal à bifurcação das veias ilíacas e 2. proximal à emergência do tronco celíaco. Com a experiência adquirida nos primeiros cinco casos, ficou claro que a manutenção do intestino grosso no campo cirúrgico dificultou o acesso às estruturas vasculares do retroperitônio e passou-se, a partir de

então, a ressecar o intestino grosso do animal doador desde o ceco até o sigmóide distal para facilitar a dissecação vascular.

Cuidado especial foi dispensado na dissecação da veia porta, uma vez que os ramos venosos provenientes do intestino proximal que nela diretamente drenam são muito curtos, friáveis e próximos uns dos outros, sendo facilmente rompidos, levando a sangramento significativo e de difícil controle. Além disso, no porco, o pâncreas envolve completamente veia porta, sendo necessária a sua secção para que a mesma possa ser inteiramente utilizada no implante (Figura 3)⁷⁵. A veia esplênica, assim como as veias pancreato-duodenais, foram também ligadas.

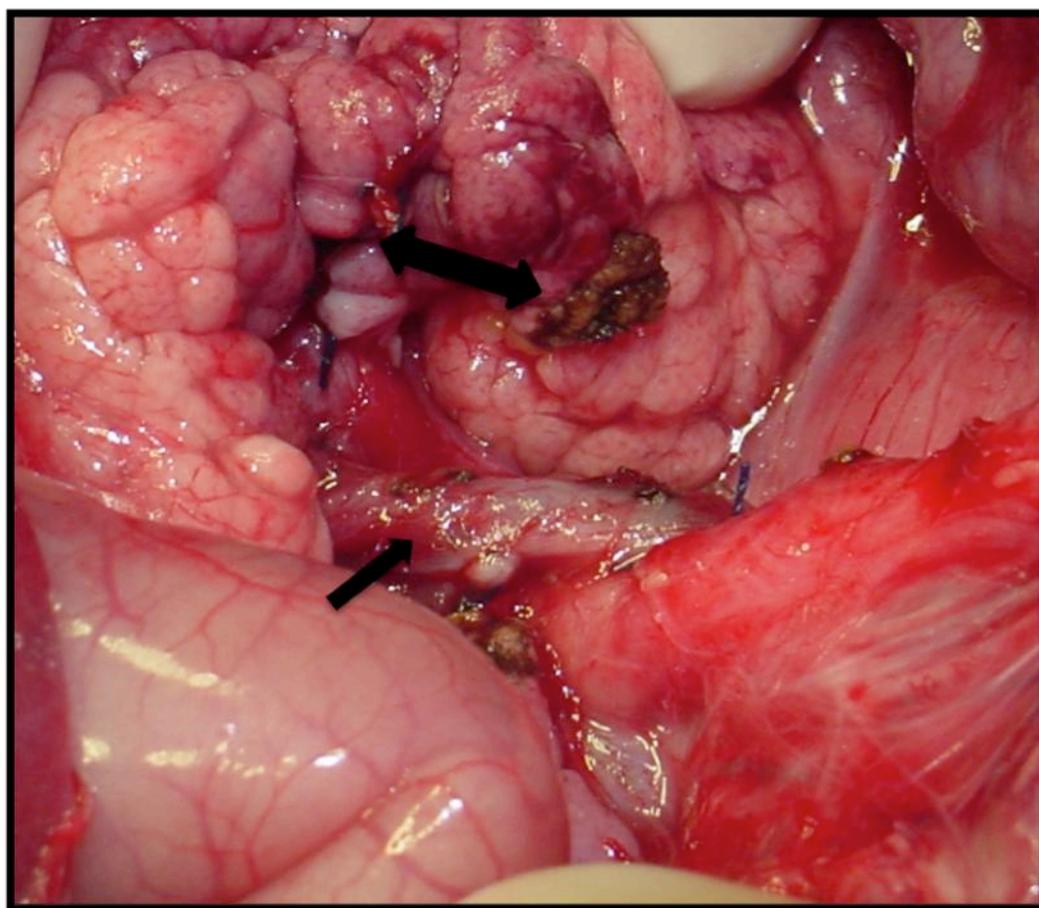


Figura 3. Fotografia do aspecto intraoperatório da cirurgia do doador de intestino. Dissecação da veia porta (seta simples). Seta dupla: secção do corpo do pâncreas

Completada a liberação do intestino e a dissecação vascular, foi administrada heparina, na dose de 100 mg / kg e ligada a aorta imediatamente proximal à bifurcação das artérias ilíacas. Uma cânula de cloreto de polivinila (PVC) 12 Fr foi instalada na aorta para administrar solução de perfusão. A aorta proximal ao tronco celíaco era também ligada e a veia porta seccionada na sua porção mais distal, imediatamente antes da bifurcação dos ramos direito e esquerdo, para permitir a drenagem do sangue e da solução de preservação (Euro Collins).

Dois litros da solução de perfusão a 4 °C foram administrados. Foram testadas três soluções de perfusão diferentes: Euro Collins, solução da Universidade de Wisconsin (Solução de Belzer – ViaSpan, Dupont Merck Pharmaceuticals, Wilmington, DE, EUA) e Celsior® (Genzyme Corporation, Cambridge, Massachusetts, EUA) (vide seção ANEXOS para a descrição detalhada da composição das soluções). O aspecto macroscópico do intestino não diferiu entre as três soluções. Em relação a complicações, apenas um animal, em que foi utilizada a solução Celsior®, desenvolveu trombose arterial. Foi optado, então, pela utilização da solução de Euro Collins na preservação do órgão, devido ao seu menor custo, menor viscosidade e maior facilidade de manipulação.

O intestino foi mantido em bacia com gelo até o implante.

O animal doador de intestino foi, então, sacrificado por meio da administração de 20 mL de cloreto de potássio 19,1 %.

Concomitantemente, o doador de sangue, com cerca de 30 kg, foi anestesiado, seguindo-se o mesmo esquema descrito anteriormente. A cânula de intubação orotraqueal, neste caso, tinha calibre de 5,5 a 6,0 Fr. Em decúbito dorsal horizontal, por meio de cervicotomia anterior ao longo do músculo

esternocleidomastoideo direito, a artéria carótida direita era isolada dos demais elementos da bainha e sua porção distal foi ligada. Uma cânula de PVC 8 Fr era instalada em sua luz e o sangue coletado em bolsas com anticoagulante (CPDA – *citrate phosphate dextrose adenine*) e armazenadas em refrigerador a 4 °C, para posterior utilização na cirurgia do receptor. O animal foi, então, sacrificado da mesma forma que o doador de intestino.

O animal receptor foi anestesiado seguindo-se o mesmo procedimento descrito para o animal doador. Em decúbito dorsal horizontal, sobre colchão térmico mantido à temperatura de 39 °C, foi intubado com cânula de calibre entre 3,5 a 4,5 Fr e ventilado com ventilador Takaoka® 675, com fração inspirada de oxigênio de 50%, volume corrente de 6 a 8 mL / kg, pressão inspiratória de 10 a 15 cm H₂O e pressão pulmonar expiratória final de 5 cm H₂O. Os sinais vitais do animal foram monitorados por meio de oximetria de pulso (Ohmeda® Biox 3740), com sensor instalado no membro superior direito, capnografia e obtenção de traçado eletrocardiográfico com cinco canais, nas derivações D₂ e D₃ registrado em aparelho HP® 78833B. Um termômetro esofágico foi também instalado, com registro obtido por meio do Biomonitor 7 Bese®.

Cefotaxima (50 mg / kg) e metronidazol(7,5 mg / kg) foram administrados por via intravenosa como profilaxia antibiótica.

Manteve-se o plano anestésico adequado pela administração de citrato de fentanila 0,05 mg / mL, 3 a 5 µg / kg como dose inicial e isoflurano, ventilador universal, em concentrações para manter hipnose e estabilidade cardiovascular (0,5 a 0,7%).

Durante o ato operatório, a pressão venosa central foi mantida entre 6 e 8 mm Hg, sendo administrados hidroxietilamido a 6% (Voluven®, Fresenius-Kabi, Bad

Homburg, Alemanha) ou solução de Ringer com lactato e sangue de acordo com o necessário.

O animal receptor foi submetido à incisão xifo-púbica e um cateter de politetrafluoretileno (PTFE - Teflon[®], Du Pont, Wilmington, Delaware, EUA) foi instalado cirurgicamente na cúpula vesical para monitoração do débito urinário durante o procedimento. Optou-se pela instalação cirúrgica do cateter, uma vez que os animais suínos do sexo feminino têm seio urogenital longo, o que dificulta sobremaneira a sondagem vesical por via uretral⁷⁵.

O intestino delgado do receptor foi ressecado desde o jejuno proximal até o íleo terminal. Grande atenção tomou-se, à semelhança do descrito para o receptor, à dissecação da veia porta para evitar lesões inadvertidas e para assegurar-se a preservação da drenagem venosa do intestino grosso, que deve ser preservado no receptor. Passou-se, então, à dissecação das estruturas vasculares: a aorta infra-renal foi completamente isolada até a sua bifurcação e a veia cava, entre a junção das veias ilíacas até a desembocadura das veias renais. O enxerto foi colocado na cavidade abdominal do receptor, com as alças intestinais ainda envoltas por compressa, o que diminui a manipulação das mesmas e, também, impede que elas dificultem as anastomoses vasculares. O fluxo na aorta do receptor foi interrompido, nesse momento, com pinça vascular do tipo Satinsky, para a realização da anastomose término-lateral entre a aorta do doador e a aorta do receptor, sendo realizada sutura contínua com fio inabsorvível de polipropileno 6-0. Reposicionou-se, então, a pinça vascular na aorta do doador, restabelecendo o fluxo da aorta do receptor mas o enxerto não foi, ainda, perfundido. Procedeu-se, a seguir, a anastomose venosa, entre a veia cava do receptor e a veia porta do doador. Esta anastomose era realizada com

sutura contínua de fio de polipropileno 7-0, com fator de crescimento. Foi testada, em quatro animais, a realização de anastomose término-terminal entre a veia porta do receptor e a veia porta do doador. A confecção dessa anastomose mostrou-se de maior dificuldade técnica e o resultado quanto à drenagem do enxerto era visualmente pior, com algumas áreas de estase venosa, macroscopicamente perceptíveis. Optou-se, então, por padronizar a derivação sistêmica, ou seja, entre a veia cava do receptor e a veia porta do enxerto (Figura 4).

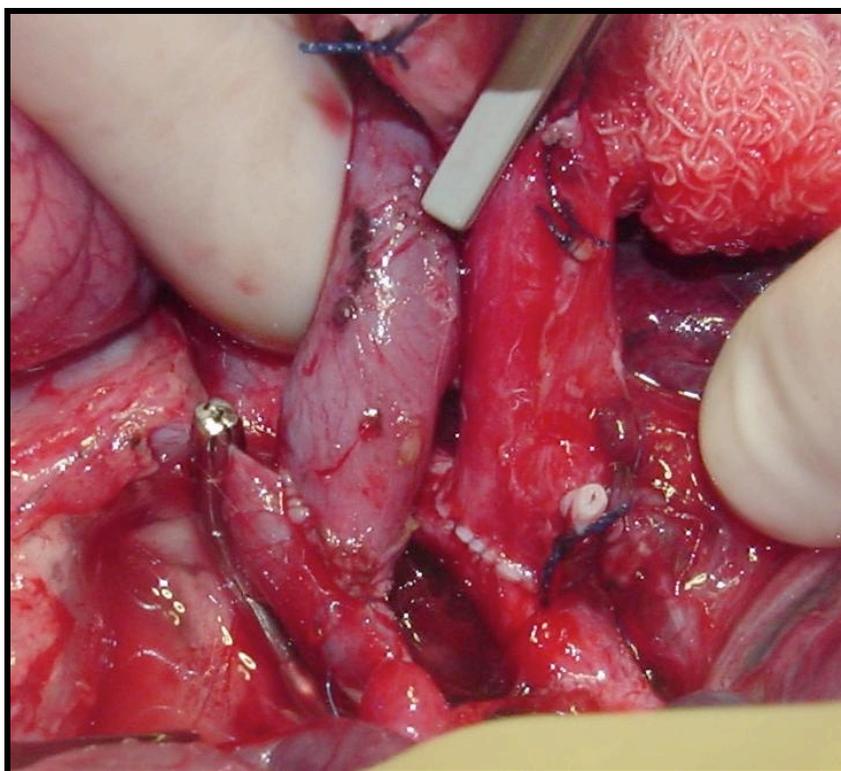


Figura 4. Fotografia do aspecto intraoperatório das anastomoses vasculares (venosa à esquerda da figura e arterial, à direita) imediatamente antes da reperfusão . Notar que as anastomoses são feitas término-lateralmente entre o vaso do enxerto e a aorta e a veia cava inferior do receptor, e a sutura é contínua

Antes do término da anastomose venosa, o enxerto foi perfundido com 500 mL de solução gelada de albumina 5 %. Esta solução foi infundida por sonda de PVC instalada na extremidade proximal da aorta do doador. A solução de

preservação foi drenada pela veia porta do doador. Ao final da infusão, a sonda foi retirada e a aorta do doador, ligada na altura do tronco celíaco. A sutura venosa foi completada e as pinças hemostáticas, retiradas (Figura 5). Imediatamente antes da reperfusão, foram administrados 20 mg / kg de metilprednisolona.

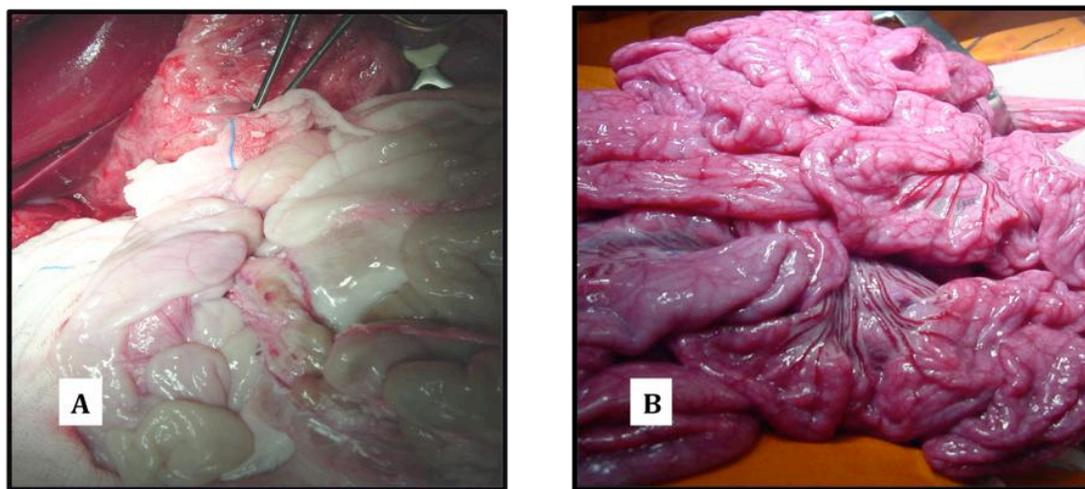


Figura 5. Fotografia do aspecto intraoperatório das alças intestinais. A – alças perfundidas com a solução de preservação. B – aspecto das alças após a reperfusão

Nos primeiros três experimentos, os animais doadores de intestino foram somente 1 a 2 kg menores que os receptores. Houve, nestes casos, comprometimento da vascularização do enxerto, principalmente venosa, como consequência do fechamento da parede sob tensão. Foi testada a ressecção de 135 cm do intestino proximal em quatro animais. A acomodação na cavidade abdominal foi satisfatória, porém, a ressecção mostrou-se trabalhosa devido às particularidades da irrigação intestinal do suíno e sangramentos foram frequentes. Além disso, anastomose intestinal proximal ficava mais tensa. Tentou-se, então, a ressecção do intestino distal, cerca de 200 cm, em cinco animais, que se mostrou tecnicamente mais fácil e também eficiente na adequação do tamanho do enxerto para a cavidade abdominal do receptor. Entretanto, os animais apresentavam diarreia profusa que acreditou-se que

fosse devido à diminuição da capacidade absorptiva secundária à extensa ressecção intestinal. Ponderou-se, também, que a manipulação intestinal necessária para a ressecção poderia levar a lesão adicional e interferir com os resultados. Foi decidido, então, pela utilização de doadores significativamente menores, 10 kg a menos que o receptor, o que resolveu o problema do tamanho do enxerto sem ocasionarmos lesão adicional ao intestino.

A diarreia, no entanto, mostrou-se um problema persistente e independente da redução do comprimento do enxerto implantado. Os animais apresentaram comprometimento da perfusão periférica e do equilíbrio hemodinâmico e deterioração da condição clínica. Optamos por manter o intestino grosso do receptor, resolvendo-se, definitivamente, o problema da diarreia no período PO precoce.

A reconstrução intestinal iniciou-se com anastomose término-terminal entre o íleo terminal do doador e o do receptor, realizada com sutura contínua, em dois planos, de fio de polipropileno 5-0. Foram retirados mais dois fragmentos do jejuno proximal do doador, após a reperusão, que foram processados da maneira anteriormente descrita. A seguir, foi realizada a anastomose entre o jejuno do doador e do receptor. Devido à falta de mobilidade da porção terminal do duodeno, foi padronizada a anastomose látero-lateral, uma vez que esta se mostrou de maior facilidade técnica e resultado final mais satisfatório, que a anastomose término-terminal inicialmente realizada.

Após as anastomoses intestinais, foi realizada uma gastrostomia à Stamm na parede anterior do estômago, na região do antro, utilizando sonda de Malecot ou Pezzer 14 Fr, com fio de prolene 4-0, que foi exteriorizada na parede lateral esquerda do abdome, fixada ao peritônio parietal com 4 pontos de polipropileno 4-0 e ao dorso

do animal. A sonda permaneceu aberta nas primeiras 12 horas de PO e teve como finalidade descomprimir o estômago que, caso contrário apresentou grande distensão, chegando mesmo a provocar desconforto respiratório; tendo havido, inclusive, um caso de parada cardio-respiratória no PO imediato relacionada a volumosa distensão gástrica. É possível que essa obstrução transitória da via de saída gástrica esteja associada ao *torus pyloricus* presente nos animais suínos, assim com nos ruminantes, que consiste em uma proeminência constituída de músculo e glândulas, que se projeta da parede da curvatura menor e diminui consideravelmente o lúmen da região pilórica⁷⁶.

O cateter urinário foi retirado e o orifício da cúpula vesical, suturado com fio absorvível 4-0. A parede abdominal foi suturada com polipropileno 2-0, com sutura contínua em dois planos: 1 – peritônio juntamente com a musculatura da parede e 2 – pele e tecido celular subcutâneo.

Antes do fechamento em plano único da cervicotomia, foram retirados os cateteres da veia jugular interna e da artéria carótida esquerdas, que eram definitivamente ligadas.

Ao final do procedimento, o animal recebeu uma nova dose de antibióticos (cefotaxima e metronidazol) e analgésicos (dipirona e tramadol, nas doses previamente descritas).

Após despertar da anestesia, retomar o controle respiratório, e ter a cânula oro-traqueal retirada, o animal foi levado a um local reservado, com fonte externa de calor radiante, onde permaneceu durante todo o período de acompanhamento PO.

O animal permaneceu em jejum na noite do procedimento, com a sonda de gastrostomia aberta em coletor fixado ao dorso do animal. A gastrostomia foi

fechada na manhã do dia seguinte e água com glicose era oferecida *ad libitum*. 20 g de glicose diluídas em solução de Ringer aquecida, 500mL foram administradas de forma intermitente, três vezes ao dia. A analgesia foi também ministrada intermitentemente e consistia de tramadol (2 mg / kg) e dipirona (30 mg / kg), de 8 em oito horas.

Os antibióticos foram mantidos até a morte dos animais, no terceiro dia de PO.

O projeto inicial visava manter os animais vivos por pelo menos 10 dias. Na cirurgia, fez-se uma jejunostomia proximal para realizarmos biópsia de controle do intestino no terceiro e no sétimo dia de PO. Com o animal sob sedação com midazolam (0,1 mg / kg) e fentanila (3 µg / kg) administrados por via intravenosa pelo cateter da veia jugular interna direita e com suplementação de oxigênio por nebulização, realizou-se biópsia endoscópica pela jejunostomia, a aproximadamente 5 cm da borda. No décimo dia, novo fragmento foi obtido imediatamente antes do sacrifício do animal. As biópsias foram processadas conforme descrição anterior. Em 8 experimentos foi administrado tacrolimus (0,15 mg / kg / dia) e prednisona no PO, entretanto pouquíssimas alterações atribuíveis a RCA foram observadas até o final da primeira semana. Deixou-se, então, de administrar imunossupressores nos demais animais e, mesmo assim, a RCA ocorreu somente sete dias após o procedimento. Apenas em dois casos a RCA foi detectada no quinto dia de PO, em animais que não sobreviveram até o final do experimento. Apesar disto, os animais, a partir do quinto dia de PO, apresentaram deterioração do estado geral, desenvolvendo sinais e sintomas sugestivos de sepse, com perfusão periférica lenta, cianose de extremidades, hipoatividade e distensão abdominal. Por esse motivo, foi considerada inadequada a prorrogação da vida dos animais além do quinto dia de PO.

Passou-se, então, a estudar a LIR, mantendo-se os animais vivos somente três dias após a cirurgia, diminuindo-se o sofrimento do animal, a duração e o custo do experimento.

Ao todo, 25 experimentos foram necessários para a padronização final do projeto.

Como conclusão, o modelo experimental escolhido a partir do projeto piloto, constituiu-se de:

1. Três porcos híbridos das raças Ladrace e Large-White
 - a. um animal de 45 dias de vida, com cerca de 30 kg, o doador de sangue;
 - b. um animal de 40 dias de vida, com cerca de 20 kg, o receptor;
 - c. um animal de 30 dias de vida, com cerca de 10 kg, o doador do enxerto.
2. Preservação com 2 L de solução de Euro Collins a 4 °C;
3. Manutenção do intestino grosso do receptor;
4. Anastomoses vasculares:
 - a. Anastomose arterial – término-lateral entre a aorta do doador e a aorta infra-renal do receptor;
 - b. Anastomose venosa – término-lateral entre a veia porta do doador e a veia cava inferior do receptor (derivação sistêmica).
5. Anastomoses intestinais:
 - a. Látero-lateral entre duodeno do receptor e jejuno proximal do doador;
 - b. Término-terminal entre íleo terminal do doador e íleo terminal do receptor.

6. Gastrostomia descompressiva;
7. Administração de metilprednisolona, 20 mg / kg no momento da reperfusão;

Nenhuma droga imunossupressora foi administrada no PO.

3.2 Materiais e métodos

No presente estudo foram utilizados três porcos em cada experimento, conforme descrição no projeto piloto. O preparo dos animais e o procedimento foram idênticos aos descritos no item anterior.

Os animais foram divididos em dois grupos:

- Grupo 1 (n = 12) – 90 minutos de isquemia
- Grupo 2 (n = 8) – 180 minutos de isquemia.

Três fragmentos de jejuno proximal foram obtidos por experimento:

- Fragmento 1 – basal – obtido imediatamente após a laparotomia do doador
- Fragmento 2 – obtido 30 minutos após a reperfusão do órgão
- Fragmento 3 – obtido três dias após o procedimento.

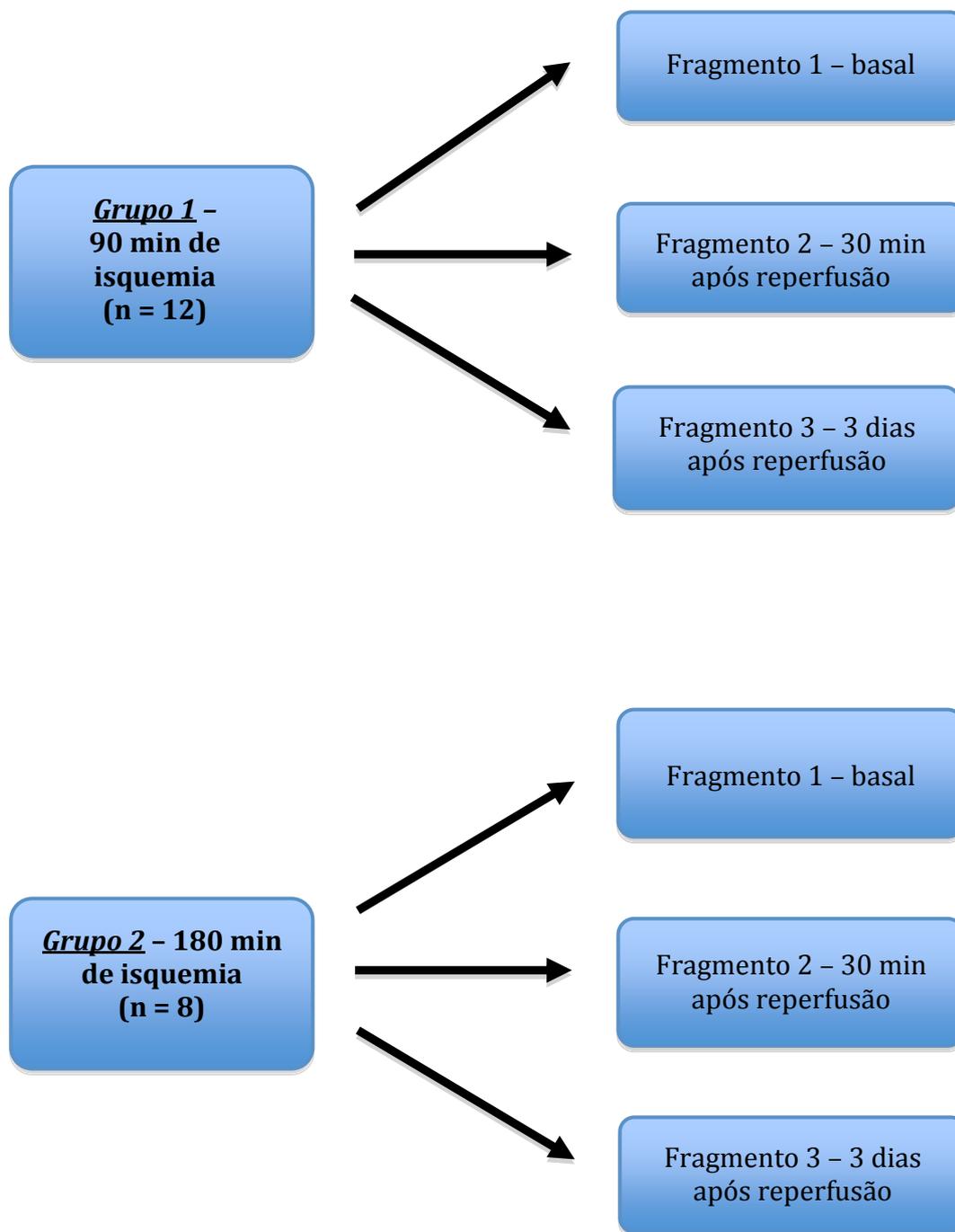


Figura 6. Organograma apresentando esquema do modelo experimental

Cada fragmento de intestino foi dividido em duas partes: uma delas foi preservada em solução tamponada de formaldeído a 10 % e, após ser incluída em bloco de parafina, foram obtidos cortes histológicos de 4 μ m . Estes foram destinados à avaliação histológica por coloração hematoxilina-eosina (HE) e à análise imunohistoquímica. A segunda parte foi congelada em nitrogênio líquido a -70 °C para estudos moleculares que serão descritos a seguir.

Os fragmentos foram avaliados conforme descrição que se segue.

3.2.1 Análise histológica

As lâminas foram preparadas no Laboratório de Anatomia Patológica do HCFMUSP.

Os fragmentos foram avaliados por patologista experiente que desconhecia a qual grupo pertencia cada lâmina. A mucosa foi o principal foco de atenção na avaliação da LIR, conforme previamente descrito na literatura^{21-23,77}.

A lesão tecidual foi analisada semiquantitativamente, atribuindo-se notas de 0 a 4 para cada alteração detectada. Foram avaliados: a presença de edema, congestão capilar, infiltração por neutrófilos, grau de depleção das células caliciformes, presença de descamação do epitélio, grau de perda da arquitetura dos vilos, grau de perda da arquitetura das criptas, presença e grau de hemorragia, infarto transmural, e a presença de rejeição (Figura 7). As alterações classificadas como 0 ou 1 foram denominadas leves e aquelas com classificação 2, 3 e 4, foram denominadas moderadas/graves.

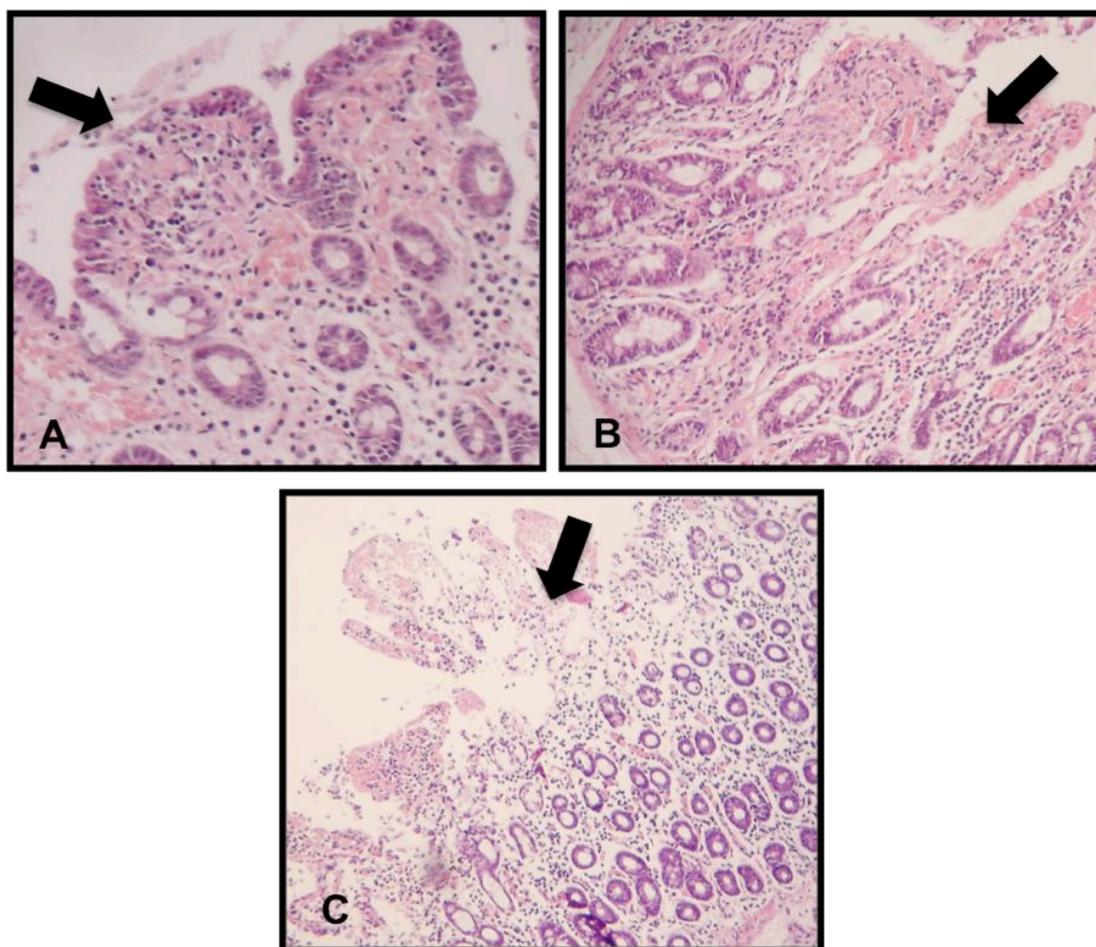


Figura 7. Alterações histológicas detectadas pela coloração de HE. Na fotomicrografia A, aumento de 200x, pode ser identificados alargamento de vilo, congestão vascular e erosão superficial (seta), todos classificados como 1. Na fotomicrografia B, aumento de 200x podem ser visualizada erosão maciça das vilosidades, classificada como 3 (seta). Na fotomicrografia C, aumento 100x, visualiza-se perda completa da arquitetura dos vilos, classificada como 4 (seta).

3.2.2 Análise imunoistoquímica

As peças foram submetidas a estudo imunoistoquímico para identificação da mieloperoxidase (MPO). As lâminas foram preparadas no Laboratório de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

A MPO é uma proteína neutrofílica armazenada nos grânulos azurófilos. Utilizando o superóxido e o peróxido de hidrogênio produzidos na explosão respiratória

dos neutrófilos, produz ácido hipocloroso e oxidantes reativos, que são componentes importantes no sistema microbicida dos neutrófilos. Ela foi utilizada, neste estudo, para facilitar a identificação e a contagem dos neutrófilos infiltrando a mucosa intestinal.

Inicialmente, procedeu-se à desparafinização das lâminas, deixadas por 24 horas em estufa a 60 °C, sendo, a seguir, colocadas no Xilol, inicialmente, a 60 °C por 20 minutos e depois mais 20 minutos na temperatura ambiente. A seguir, passaram em etanol 100, 85 e 70 %, em ciclos de 30 segundos em cada concentração. As lâminas foram, então, lavadas em água corrente e destilada. Foi realizada a recuperação de antígenos com solução tampão de citrato 10 mM, pH 6,0 em panela de pressão por 4 minutos. Após a despressurização total, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada. A peroxidase endógena foi bloqueada com H₂O₂ 3 % (água oxigenada 10 volumes), com três trocas de 10 minutos cada. As lâminas foram lavadas em água corrente destilada e com solução salina tamponada com fosfatos (*PBS-phosphate buffered saline*) 10 mM, com pH 7,4 por cinco minutos.

3.2.2.1 Mieloperoxidase

As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário, diluído em título pré-estabelecido conforme quadro abaixo, em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1 % (Sigma-Aldrich Inc[®], A9647, EUA) e azida sódica (NaN₃) 0,1 % por 18 horas a 4 °C em câmara úmida.

Quadro 1. Anticorpos anti-mieloperoxidase utilizados no modelo experimental

ANTICORPOS	CLONES	TÍTULOS	FABRICANTES
Mieloperoxidase	Policlonal feito em coelho	1:1000	DakoCytomation, cat#A0398, Carpinteria, EUA

Elas foram, então, lavadas em tampão PBS, com três trocas de três minutos cada. Foram incubadas por 30 minutos a 37 °C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer Detection System, Leica, RE7280-k, Newcastle, Reino Unido), lavadas novamente com tampão PBS com três trocas de três minutos cada e incubadas com NovoLink Polymer por 30 minutos a 37 °C e mais uma vez lavadas em tampão PBS com três trocas de três minutos cada.

As lâminas foram, posteriormente, incubadas por cinco minutos a 37 °C, ao abrigo da luz, na seguinte solução substrato: 100 mg % de 3,3' *Diaminobenzidine Tetrahydrochloride* (DAB) (Sigma-Aldrich Inc[®], D-5637, EUA); 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO); 1 mL de H₂O₂ 6 % (água oxigenada 20 volumes); 100 mL de PBS. Observou-se, ao microscópio, como produto final da reação, o desenvolvimento de precipitado castanho dourado nas lâminas controle. As lâminas foram novamente lavadas em água corrente e destilada por três minutos, contra-coradas com hematoxilina de Harris por um minuto e, novamente, lavadas em água corrente destilada. A seguir, foram imersas em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5 %) por duas vezes, lavando-se em seguida em água corrente destilada.

As lâminas foram, então, desidratadas em etanol 80 % por 30 segundos, etanol 95 % por 30 segundos e etanol 100 % por duas vezes de 30 segundos cada. Ficavam, agora em Xilol, por quatro vezes, durante 30 segundos.

Seguiu-se a montagem das lâminas em Entellan neu (Merk, 1.07961, Alemanha).

O controle negativo foi realizado pela omissão do anticorpo primário.

3.2.2.2 Quantificação de células MPO positivas

O citoplasma das células positivas para MPO apresentam-se com coloração castanho escuro. De cada lâmina preparada conforme descrição no item 3.2.2.1, foram fotografados 10 campos de grande aumento (400x) com área de 33864,4 μm^2 , incluindo apenas mucosa e submucosa, uma vez que as alterações provocadas pela LIR concentram-se nessa região do intestino^{21-23,77}.

As imagens foram adquiridas através de um microscópio óptico Leica DMR (Leica Microsystems gmbH, Wetzlar, Germany) equipado com câmera digital Axioca mcR 5 (Carls Zeiss MicroImagins GmbH, Göttingen, Alemanha), acoplada a computador padrão IBM (*International Business Machines*, EUA) contendo o programa Image Pro-Plus[®] versão 4.5.0.29 para Windows XP[®] (Media Cybernetics Inc[®]). Os resultados foram apresentados como número de células coradas / área total medida em células / μm^2 .

3.2.3 Análise histoquímica

As lâminas foram preparadas no Laboratório de Patologia do Instituto Adolfo Lutz e as reações realizadas no Centro de Pesquisas do Hospital A.C.Camargo.

3.2.3.1 TUNEL

O método TUNEL foi utilizado para evidenciar as células em processo de apoptose e, assim, mais facilmente quantificá-las.

O acrônimo TUNEL deriva do nome, na língua inglesa, do método de identificação de células em apoptose, *Terminal-deoxynucleotidyl-transferase-*

mediated digoxigenin-Uracil-triphosphate-FITC Nick End Labeling. Os reagentes presentes no “*kit*” utilizado (ApopTag[®] Peroxidase *in situ* Apoptosis Detection Kit – Millipore, cat# S7100, Temecula, CA, EUA) são destinados a marcar a porção 3'-OH terminal livre do ADN, *in situ*, por meio de nucleotídeos associados à digoxigenina. A digoxigenina é um esteróide encontrado exclusivamente nas flores e folhas de plantas tais como a *Digitalis purpurea*, *Digitalis orientalis* e *Digitalis lanata*. Ela é considerada um hapteno, molécula pequena com grande imunogenicidade, utilizada amplamente em biologia molecular. Em geral, anticorpos gerados contra os haptenos têm maior afinidade aos seus alvos que outros anticorpos e, portanto, conjugados com outras moléculas são utilizados como “etiquetas” imunológicas.

Os nucleotídeos presentes na solução tampão são enzimaticamente adicionados ao ADN pela transferase deoxinucleotidil-terminal – TdT, que catalisa a adição de nucleotídeos-tri-fosfatos à extremidade 3'-OH das fitas de ADN duplas ou simples. Os nucleotídeos incorporados formam oligômeros compostos de nucleotídeos conjugados com digoxigenina e de nucleotídeos não-marcados, em uma sequência aleatória. Anticorpos anti-digoxigenina conjugados à peroxidase ligam-se aos fragmentos de ADN marcados. A peroxidase gera uma coloração intensa e permanente quando exposta a substratos cromogênicos. As células em apoptose, ricas em ADN fragmentados com extremidades 3'-OH ficam, então, permanentemente marcadas, permitindo sua identificação à microscopia óptica.

A descrição detalhada do método é apresentada a seguir.

As lâminas foram desparafinizadas conforme descrição anterior, no item imunoistoquímica (item 3.2.2)

A peroxidase endógena foi bloqueada com H_2O_2 3 % (água oxigenada 10 volumes) por cinco minutos. As lâminas foram, a seguir, lavadas em água corrente, destilada, deionizada. Os tecidos foram pré-tratados com enzima proteinase K (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 10 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, lavados em água corrente, destilada e em solução salina tamponada com fosfatos (*PBS*) por cinco minutos. Foi, então, aplicada sobre o tecido, 50 μL / 5 cm^2 da solução tampão de equilíbrio e o conjunto incubado por pelo menos um minuto à temperatura ambiente. O excesso de líquido foi retirado e 55 μL / 5 cm^2 da solução descrita no Quadro 2 foi aplicada. O tecido foi incubado por uma hora a 37 °C. A seguir, o tecido foi incubado com o tampão “*stop/wash*”, preparado conforme Quadro 3, agitado por 15 segundos e deixado descansar por 10 minutos à temperatura ambiente.

Quadro 2. Solução tampão utilizada na reação de TUNEL

VOLUME	REAGENTE
77 μL	Solução tampão de reação (“ <i>Reaction buffer</i> ”)
33 μL	Enzima TdT
110 μL	Total

Quadro 3. Solução *Stop/wash* utilizada na reação de TUNEL

VOLUME	REAGENTE
1 mL	Solução tampão “ <i>Stop/wash</i> ”
34 mL	Água deionizada
35 mL	Total

Quantidade de anticorpo anti-digoxigenina suficiente para cobrir os cortes foi retirada do freezer e esperou-se que ela atingisse a temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas com PBS, três trocas de um minuto cada e a digoxigenina conjugada (50 μL / 5 cm^2) foi aplicada sobre o tecido e o conjunto incubado por 30 minutos a 37 °C. As lâminas foram lavadas em PBS, quatro trocas de dois minutos cada. A solução de DAB (*kit* DakoCytomation – diaminobenzidina – substrato cromogênico da peroxidase) foi preparada e as lâminas foram cobertas por esta solução por 10 minutos à temperatura ambiente. Neste momento, observou-se o desenvolvimento da coloração. As lâminas foram lavadas em água corrente e destilada. Procedeu-se a contra-coloração com hematoxilina de Harris por cinco segundos, seguida de lavagem em água corrente e destilada. Água amoniacal foi utilizada para diferenciação e as lâminas foram, novamente, lavadas em água corrente e destilada.

O processo de desidratação final em álcool seriado e em Xilol, bem como a montagem das lâminas seguiu-se conforme descrito na seção da imunoistoquímica (item 3.2.2.2 Mieloperoxidase).

3.2.3.2 Quantificação das células epiteliais em apoptose (TUNEL positivas)

As células em processo de morte celular programada (apoptose) apresentam-se com coloração entre castanho escuro a negra. De cada lâmina preparada conforme descrição no item 3.2.3.1, foram fotografados aleatoriamente 10 campos de grande aumento (200x), incluindo-se, necessariamente a camada mucosa, uma vez que a região de interesse para a marcação em questão foi a que compreende as células epiteliais. Foram contadas somente células do epitélio intestinal que apresentassem a coloração característica, sendo, assim, excluídas as células inflamatórias, que existem em grande número e, também, sofrem processo de apoptose.

As imagens foram adquiridas através de um microscópio óptico Leica DMR (Leica Microsystems gmbH, Wetzlar, Germany), equipado com câmera digital Axioca mcR 5 (Carls Zeiss MicroImagins GmbH, Göttingen, Alemanha) acoplada a computador padrão IBM (International Business Machines, EUA), contendo o programa Image Pro-Plus[®] versão 4.5.0.29 para Windows XP[®] (Media Cybernetics Inc[®]). Após a aquisição das imagens, utilizando-se esse mesmo programa, foi delimitada em cada lâmina, a área do epitélio intestinal utilizando-se o dispositivo apontador (“mouse”), obtendo-se os valores de área total do epitélio, expressos em μm^2 . As células epiteliais positivas situadas no interior dessa área de interesse foram contadas. Os resultados foram apresentados como número de células coradas / área de epitélio (células / μm^2) (Figura 8).

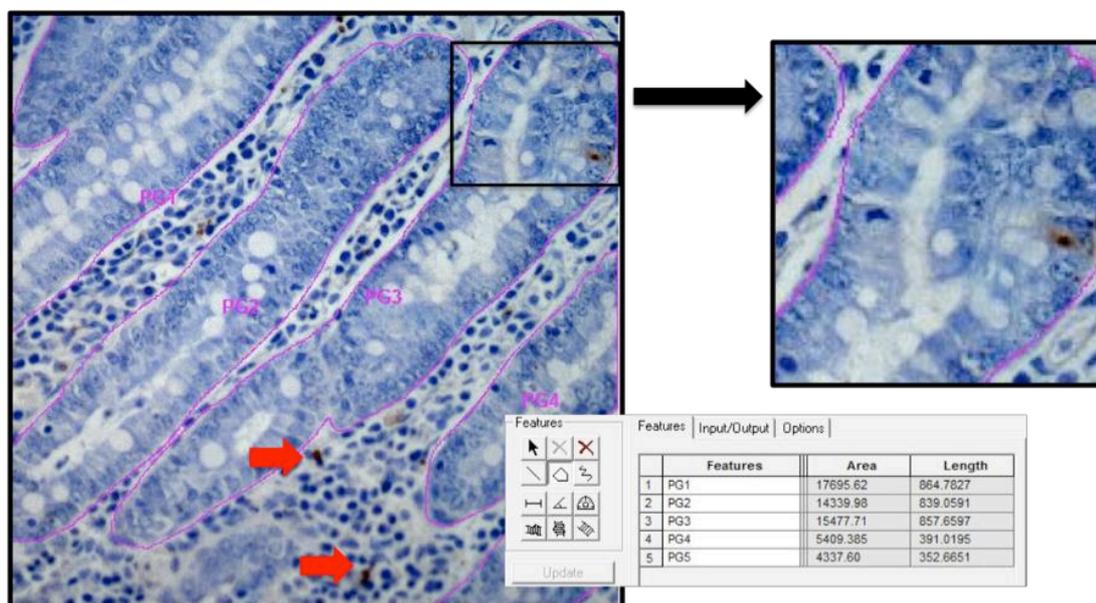


Figura 8. Fotomicrografia da mucosa intestinal corada pelo método de TUNEL, com aumento de 200x. Demarcação do epitélio (área de interesse) em cor de rosa. A área era determinada pelo programa ImageProPlus. Foram considerados positivos os corpos apoptóticos presentes no interior da área demarcada (detalhe ampliado). Corpos apoptóticos presentes no espaço subepitelial (setas vermelhas) foram desconsiderados.

3.2.4 Análise por biologia molecular

Os estudos que envolveram técnicas de biologia molecular foram desenvolvidos no Laboratório de Cirurgia Pediátrica da FMUSP (LIM – 30).

Quantificação de ARN

O conteúdo de ARN das amostras intestinais foi utilizado como medida indireta da expressão dos genes a ele relacionados.

O conteúdo de ARN foi extraído de amostras de 100 g do jejuno que, congeladas em nitrogênio líquido e fragmentadas em pulverizador de tecido (Mikro-Dismembrator U, Sartorius® AG, Goettingen, Alemanha), foram homogenizadas em 1 mL da solução Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad – CA, EUA). Essa solução foi incubada por cinco minutos em temperatura ambiente para a dissociação das nucleoproteínas. 200 µL de clorofórmio foram acrescentados à solução, que foi centrifugada na velocidade de 10.000 rotações por minuto (rpm) durante 15 minutos em temperatura ambiente. A mistura separou-se, ao fim da centrifugação, em três fases:

1. Inferior – fenol-clorofórmio, de coloração avermelhada;
2. Intermediária – composta de proteínas;
3. Superior – incolor e aquosa que continha o ARN.

A última fase foi transferida para um tubo limpo com álcool isopropílico. Esta nova solução permaneceu em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente e foi submetida a nova centrifugação (10.000 rpm por 15 minutos). O ARN

acumulou-se no fundo do tubo. O precipitado foi suspenso novamente em água bidestilada tratada com 0,01 % de Dietilpirocarbonato (DEPC) e armazenado a -70 °C.

Seguiu-se, então, a quantificação do ARN extraído por espectrofotometria, utilizando-se o Biophotometer (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemanha) utilizando-se absorvância de 260 nm. A pureza das amostras foi verificada determinando-se razão de 260/280, tendo variado de 1,7 a 2,0. A integridade do ARN isolado foi determinada por eletroforese em gel de agarose de 1 µg do material, por meio da visualização, após coloração por brometo de etídio, das bandas ribossômicas de ARN de 18 S e 28 S.

A fita de ADN complementar (cADN) foi preparada por transcrição reversa de 3 µg de ARN, utilizando-se 200 U de SuperScript III RNaseH transcriptase reversa (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad – CA, EUA) e oligo(dT)s como “*primers*”.

3.2.4.1 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A PCR é um método de amplificação de ADN e foi utilizado no presente projeto para a avaliação da expressão dos genes em estudo.

Os “*primers*” específicos utilizados em nosso estudo: pré-pró-ET-1, pró-IL-6, *Bcl-XL*, *Bak* e β-actina foram designados de sequências de mARN porcinos publicadas (número de acesso do GenBank: X0783, M86722, AF216205, AJ001204 e U07786). Em todos os experimentos, o gene da β-actina foi utilizado como controle interno. Em todas as reações, o controle negativo foi feito com água bidestilada no lugar de cADN.

As sequências dos “*primers*”, as temperaturas ótimas de associação (T_a) do ADN e o tamanho da amplificação estão listados no Quadro 4. A PCR foi realizada num volume final de 25 μ L, compostos de 3 μ L do cADN sintetizado, 20 pmol de cada “*primer*”, senso e antisenso, 200 μ L de cada deoxinucleotídeo (2'-deoxinucleosídeo 5'-trifosfato – dTNP), 1,5 mmol de $MgCl_2$, 2,5 μ L de tampão da enzima e 2 U de Taq-polimerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA).

Quadro 4. Quadro demonstrando os as sequências de pares de bases, o tamanho, a temperatura ótima de associação e o número de ciclos necessário para amplificação dos genes

GENE	SEQUÊNCIA DOS “ <i>PRIMERS</i> ”	TAMANHO (BP)	T_a ($^{\circ}C$)	NÚMERO DE CICLOS
Pré-pró-endotelina-1	5'tga tta tgc ctc tgc tgt ttg tg 3' 5'gta tgg gac aat gtg ttc tgg ag 3'	233	65	31
Pró-interleucina-6	5'atg aac tcc ctc tcc aca age 3' 5'tgg ctt tgt ctg gat tct ttc 3'	493	59	31
<i>Bcl-XL</i>	5'gga gct ggt ggt tga ctt tc 3' 5'cta ggt ggt cat tca ggt aag tg 3'	518	51	31
<i>Bak</i>	5'cta gaa cct agc agc acc at 3' 5'cga tct tgg tga agt act c 3'	151	58	35
β -actina	5'tac ctc atg aag atc ctc 3' 5'atc tcc ttc tgc atc ctg tc 3'	391	55	23

T_a – temperatura ótima de associação

bp – pares de bases

Cada um dos genes teve sua reação preparada individualmente. As amostras foram processadas de acordo com seus parâmetros, num mesmo termociclador: Peltier Thermal Cycle-200 (MJ Research[®], Waltham, Massachusetts, EUA).

As amostras foram, inicialmente, desnaturadas a 94 °C por cinco minutos e a amplificação foi realizada, sendo seguida de ciclos de desnaturação também a 94 °C por 60 segundos, associação por 60 segundos e extensão a 72 °C por 60 segundos no termociclador. O ciclo final era seguido por um período de 10 minutos de extensão a 72 °C. Cada um dos genes tem a temperatura ótima de associação descrita no Quadro 4.

Foram feitos estudos preliminares para cada gene para determinar o número ótimo de ciclos que proporcionaria uma relação linear entre número crescente de ciclos e a quantidade de produtos da reação em cadeia da polimerase. O número de ciclos foi estabelecido dentro da relação linear. Cada reação foi repetida três vezes para confirmar os dados. O produto amplificado, 10 µL de solução, foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,8 % e corados com brometo de etídio para a visualização das bandas.

3.2.4.2 Análise semiquantitativa dos produtos da reação em cadeia da polimerase

As imagens do gel de agarose foram captadas com o sistema de imagem Kodak Gel Logic 100 Imaging System (Kodak Digital Science[®], Rochester, Nova Iorque, EUA). A densidade das bandas foi determinada utilizando-se o Kodak Molecular Imaging Software (Kodak Digital Science[®], Rochester, Nova Iorque, EUA).

O gene da β -actina foi utilizado como controle interno de transcrição do ARN, bem como fator de correção para a quantidade de cADN sintetizado. Os resultados das amplificações dos genes estudados foram expressos como razão da densidade da banda da β -actina.

3.2.4 Análise Estatística

A descrição dos grupos quanto às características histológicas foi realizada por meio das frequências de aparecimento em cada grupo e a avaliação da existência de associação entre a intensidade da lesão e o tempo de isquemia foi realizada utilizando-se o teste exato de Fisher.

A descrição dois grupos quanto à contagem de células positivas para MPO bem como quanto à expressão dos genes da pré-pró-ET-1, pró-IL-6, Bak e Bcl-XL foi realizada utilizando-se as suas medianas, valores máximos e mínimos e a comparação entre os grupos 1 e 2 foi feita por meio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney nos três diferentes tempos: basal, 30 minutos e três dias após reperfusão.

A análise da correlação entre as lesões histológicas detectadas pelo o HE e o tempo de isquemia, bem como a análise da correlação entre as lesões o tempo decorrido após a reperfusão foi feita utilizando o teste exato de Fisher. A comparação dos resultados dentro cada grupo foi realizada utilizando-se o teste de Friedman, tendo sido realizado o teste post hoc de Dunn quando identificada uma diferença, estatisticamente significativa, entre as três medianas comparadas.

As análises foram realizadas usando-se o software estatístico SPSS 13.0 e o teste de Dunn foi realizado utilizando-se o software GraphPad InStat V.3.06, tendo sido adotado nível de significância de 5 %.

4 Resultados

Foram realizados 24 experimentos, tendo sido excluídos quatro animais: três que faleceram entre o período de PO imediato e o primeiro dia PO e um que teve complicação vascular, que consistiu de trombose venosa do enxerto. Os óbitos precoces ocorreram por:

1. dificuldade de intubação orotraqueal, ventilação com pressão positiva e pneumotórax bilateral, com óbito na sala operatória;
2. reação transfusional, clinicamente diagnosticada por elevação da temperatura corpórea imediatamente após infusão do hemoderivado (sangue total), associada a reação eritematosa generalizada, tendo o animal evoluído com hipotensão e óbito na sala operatória
3. hipertermia maligna, clinicamente diagnosticada por elevação da temperatura central ($> 40\text{ }^{\circ}\text{C}$) e desaparecimento da curva de monitoração da fração expirada de CO_2 .

Os 20 animais restantes foram mantidos até o terceiro dia de PO, conforme descrito na seção do projeto piloto.

As alterações detectadas à microscopia óptica, bem como os valores individuais obtidos pela técnica imunoistoquímica, histoquímica e de biologia molecular estão apresentados na seção ANEXOS. A seguir, os resultados são analisados como gráficos e tabelas comparativas.

4.1 Avaliação histológica

4.1.1 Hematoxilina-eosina

O grau de lesão histológica foi avaliado em fragmentos corados pela HE. Em todas as amostras foi possível detectar, no mínimo, lesão do ápice dos vilos. A maior parte dos fragmentos, no entanto, apresentou alterações mais extensas, com comprometimento completo dos vilos e, frequentemente, das criptas. Não houve, entretanto, associação entre as alterações histológicas avaliadas: edema, congestão capilar, infiltração por neutrófilos, grau de depleção das células caliciformes, presença de descamação do epitélio, grau de perda da arquitetura dos vilos, grau de perda da arquitetura das criptas, presença e grau de hemorragia, infarto transmural, e o tempo de isquemia, nem entre as alterações histológicas e o tempo após reperfusão (teste exato de Fisher – $p > 0,05$) (Figuras 9 e 10).

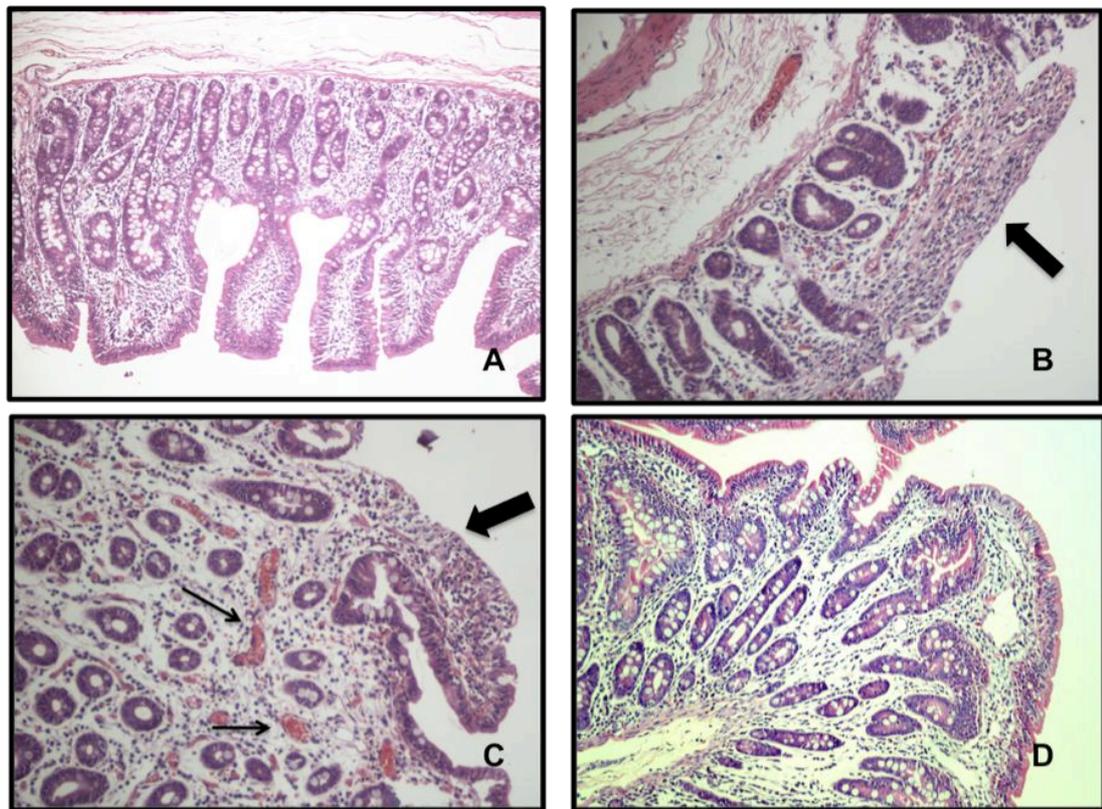


Figura 9. Fotomicrografias de microscopia óptica com aumento 100x, com coloração HE. A – aspecto normal, no tempo basal da mucosa do animal. B e C – imagem da mucosa 30 minutos após a reperusão, demonstrando edema, congestão vascular (setas finas) e ulcerações. Setas grossas: descamação superficial do epitélio. D – aspecto da mucosa três dias após o procedimento: achatamento das vilosidades e edema

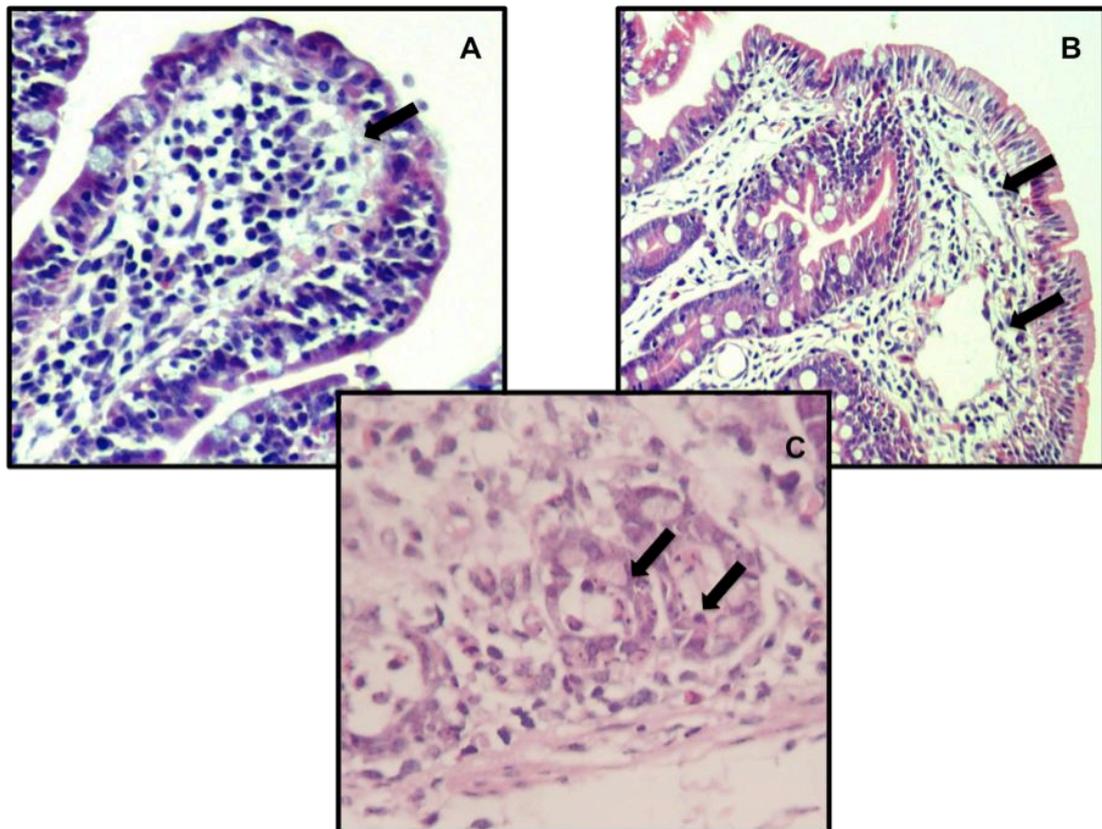


Figura 10. Detalhes de fotomicrografias da mucosa intestinal à microscopia óptica, com aumento de 100x. A – Imagem de fragmento intestinal obtido 30 minutos após reperusão. Microvilo demonstrando edema e destacamento do epitélio (seta). B – Imagem de fragmento obtido três dias após reperusão. Microvilo bastante achatado, com espaços subepiteliais (setas). C – Imagem de fragmento obtido 30 minutos após reperusão, demonstrando comprometimento do epitélio das criptas, com a presença de corpos apoptóticos

4.2 Análise Imunoistoquímica

4.2.1 *Mieloperoxidase*

A MPO tem distribuição citoplasmática e pôde ser observada pela sua coloração castanho escuro de forte intensidade na reação imunoistoquímica (Figura 11). Uma coloração acastanhada leve foi observada, também, em

células epiteliais, tendo sido considerada como fixação inespecífica do marcador, que não comprometeu, no entanto, a identificação das células positivamente marcadas.

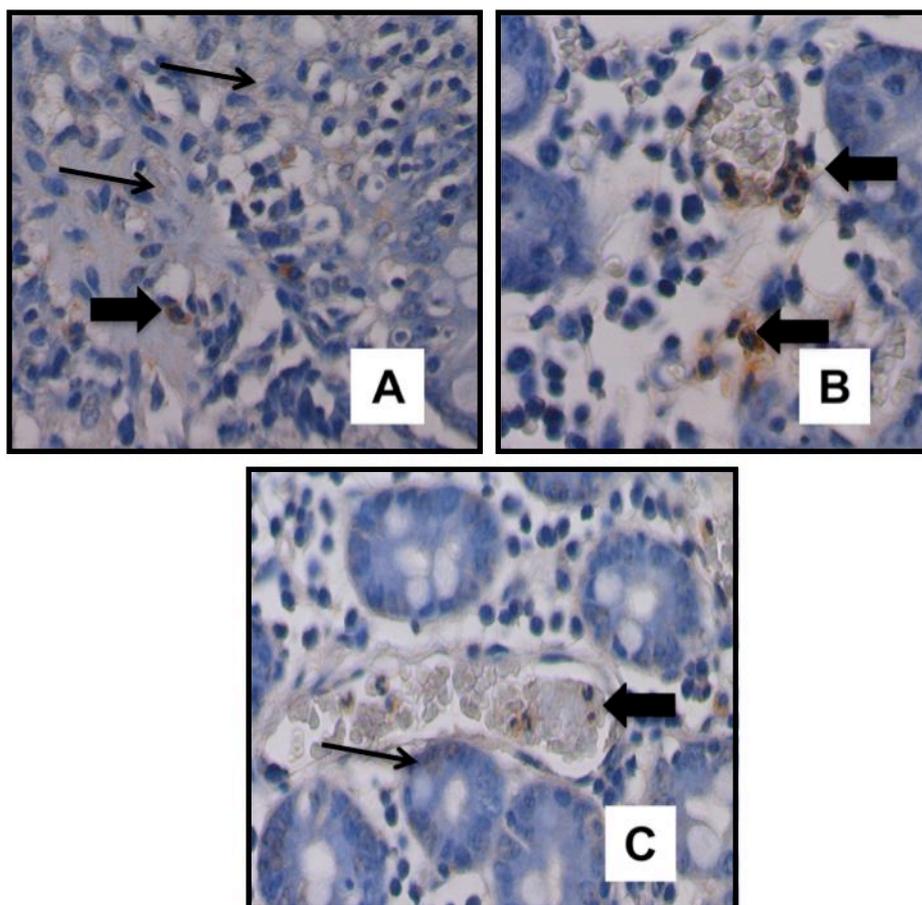


Figura 11. Fotomicrografia digitalizada para contagem de células marcadas pela técnica de imunohistoquímica. As células positivas para mieloperoxidase apresentam-se com coloração castanho escuro (aumento de 400x) (setas grossas). A captação inespecífica da coloração (setas finas) não prejudicou a análise. Fotomicrografias de animais pertencentes ao grupo 2. A – tempo basal; B – 30 minutos após a reperusão; C – três dias após a reperusão. Notar a presença de células marcadas em A, esparsas na mucosa. Nota-se em B, a presença de células positivas para MPO no lúmen vascular bem como infiltrando a sua parede. Existem, ainda, células marcadas no espaço subepitelial. Em C, achados muito semelhantes aos descritos em B

Somente os fragmentos de 17 animais puderam ser avaliados estatisticamente. Três dos 12 animais do grupo 1 não sobreviveram até o terceiro dia de PO e tiveram que ser excluídos da avaliação estatística devido à necessidade de emparelhamento das amostras. Para a comparação das medianas da contagem de células positivas para MPO, utilizou-se o teste de Mann-Whitney. Os resultados constam da Tabela 1.

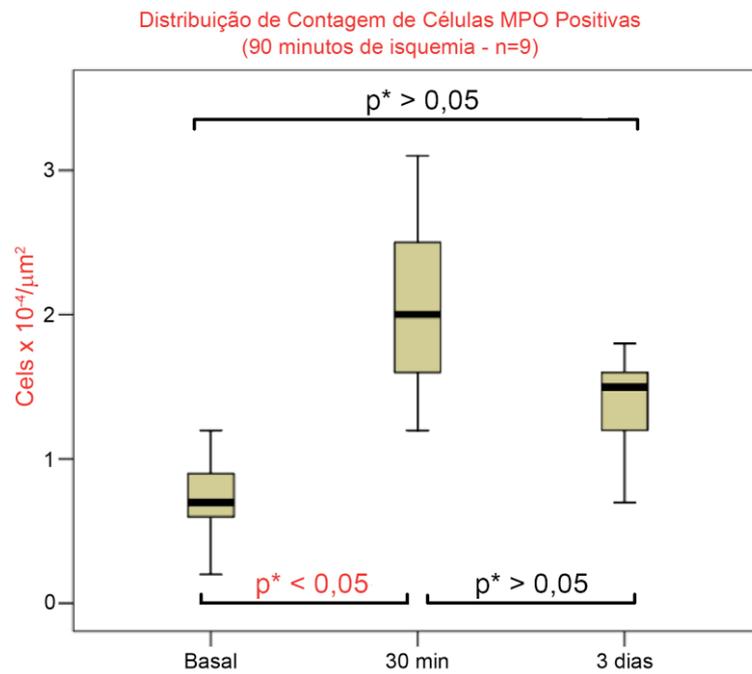
Tabela 1. Comparação da contagem de células positivas para MPO entre os grupos 1 e 2, nos diferentes tempos (basal, 30 minutos e três dias após reperfusão). Nenhuma diferença significativa foi encontrada

CÉLULAS POSITIVAS PARA MPO	GRUPO ¹	MEDIANA	VALOR MÁXIMO	VALOR MÍNIMO	MANN-WHITNEY (p)
BASAL (n = 9)	1	0,7	1,2	0,2	0,110
BASAL (n = 8)	2	0,5	0,8	0,2	
30 MINUTOS (n = 9)	1	2,0	3,1	1,2	0,018
30 MINUTOS (n = 8)	2	1,2	2,2	0,6	
3 DIAS (n = 9)	1	1,5	1,8	0,7	0,663
3 DIAS (n = 8)	2	1,5	1,1	2,3	

¹Grupo 1 – 90 minutos de isquemia

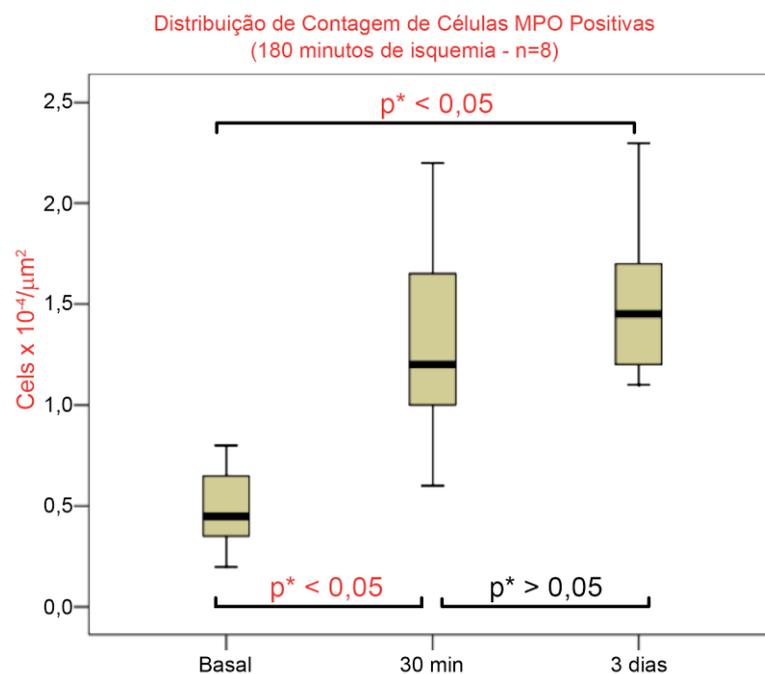
Grupo 2 – 180 minutos de isquemia

A comparação entre as medianas da contagem de células marcadas no tempo basal, 30 minutos após a reperfusão e três dias após a reperfusão, em cada grupo foi feita por meio do teste de Friedman. Uma vez constatada diferença estatisticamente significativa entre as medianas, foi realizado teste *post hoc* de Dunn, que revelou ser estatisticamente significativa a diferença entre os tempos basal e 30 minutos no grupo 1 ($p < 0,001$) e entre os tempos basal e 30 minutos ($p < 0,05$) e basal e três dias ($p < 0,001$) no grupo 2 (Figuras 12 e 13).



*Teste *post hoc* de Dunn

Figura 12. Distribuição da contagem de células MPO positivas no grupo 1 (90 minutos de isquemia), nos tempos basal, 30 minutos após reperfunção e três dias após reperfunção



*Teste *post hoc* de Dunn

Figura 13. Distribuição da contagem de células MPO positivas no grupo 2 (180 minutos de isquemia), nos tempos basal, 30 minutos após reperfunção e três dias após reperfunção

Houve, portanto, no grupo 1, com 90 minutos de isquemia, um aumento na infiltração por neutrófilos nos fragmentos 30 minutos após a reperfusão. Essa infiltração reduziu-se para níveis próximos aos basais três dias após a reperfusão. Já no grupo 2, nos fragmentos que sofreram 180 minutos de isquemia, a diferença entre a infiltração por neutrófilos no fragmento basal e no fragmento três dias após a reperfusão permaneceu estatisticamente significativa.

4.3 Análise histoquímica

4.3.1 Contagem das células epiteliais em apoptose pelo método TUNEL

Conforme descrito na seção materiais e métodos, foram consideradas positivas somente as células marcadas com a coloração castanho escuro característica presentes no epitélio intestinal.

Puderam ser analisados fragmentos intestinais de 13 animais.

Para a comparação das medianas da contagem de células epiteliais em apoptose foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Pela necessidade de emparelhamento das amostras, três animais do grupo 1 foram excluídos, uma vez que os fragmentos de três animais, no tempo 3, não se mostraram adequados para a realização da análise. Os resultados constam da Tabela 2, não tendo sido detectadas diferenças estatisticamente significantes.

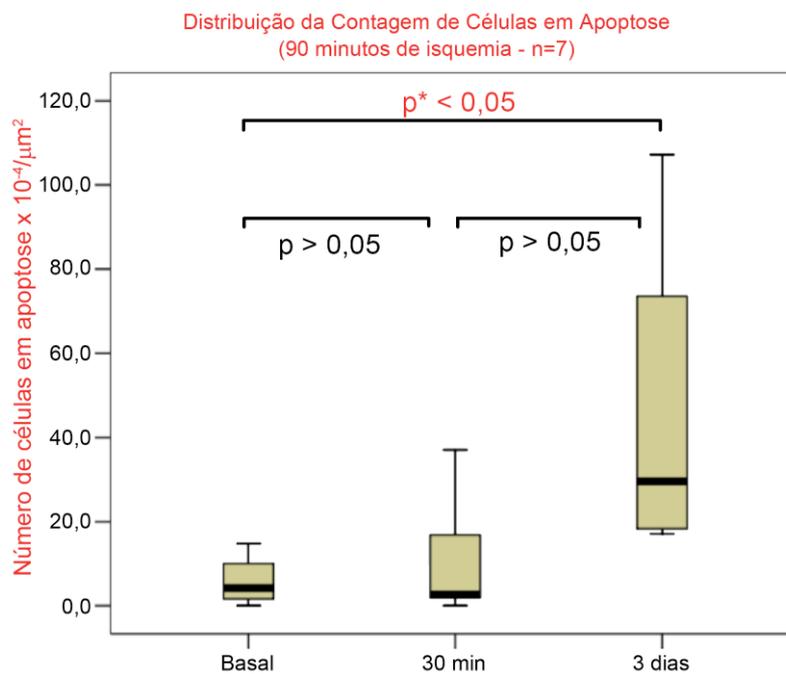
Tabela 2. Comparação da contagem de células em apoptose marcadas pelo método TUNEL entre os grupos 1 e 2, nos diferentes tempos (basal, 30 minutos e três dias após reperfusão). Nenhuma diferença significativa foi encontrada

CÉLULAS EM APOPTOSE	GRUPO ¹	MEDIANA	VALOR MÁXIMO	VALOR MÍNIMO	MANN-WHITNEY (p)
BASAL (n = 7)	1	4,2	14,8	0,0	0,668
BASAL (n = 6)	2	6,5	24,3	1,4	
30 MINUTOS (n = 7)	1	2,6	37,1	0,0	0,775
30 MINUTOS (n = 6)	2	10,2	44,4	1,8	
3 DIAS (n = 4)	1	29,6	107,3	17,2	0,136
3 DIAS (n = 6)	2	15,1	38,4	2,1	

¹Grupo 1 – 90 minutos de isquemia

Grupo 2 – 180 minutos de isquemia

A comparação entre as medianas da contagem de células marcadas no tempo basal, 30 minutos após a reperfusão e três dias após a reperfusão, em cada grupo separadamente foi feita por meio do teste de Friedman. Uma vez constatada diferença estatisticamente significativa entre as medianas, foi realizado teste *post hoc* de Dunn, que revelou ser estatisticamente significativa a diferença entre os tempos basal e três dias no grupo 1 ($p < 0,05$). (Figuras 14 e 15)



* Teste *post hoc* de Dunn

Figura 14. Evolução temporal do número de células epiteliais em apoptose no grupo 1 (90 minutos de isquemia)

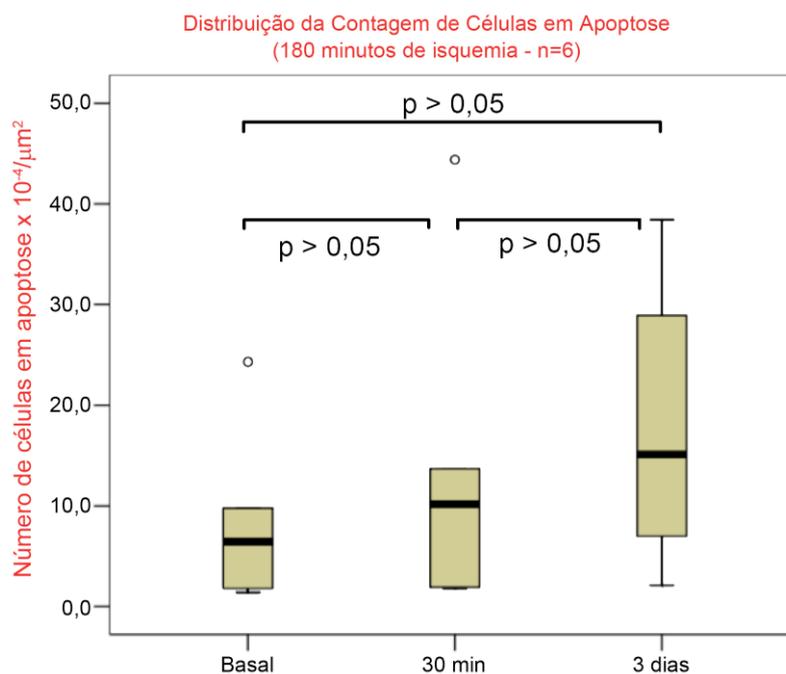


Figura 15. Evolução temporal do número de células epiteliais em apoptose no grupo 2 (180 minutos de isquemia)

O aumento encontrado no número de células epiteliais em processo de apoptose no grupo submetido a menor tempo de isquemia resultou estatisticamente significativo.

4.4 Estudos Moleculares

Devido a dificuldades com a preservação do material, foi possível a utilização dos intestinos de 12 animais para os estudos moleculares.

4.4.1 Expressão do gene da pré-pró-endotelina-1

Comparação entre os grupos 1 e 2

A comparação da expressão do gene da pré-pró-ET-1 entre os grupos 1 e 2 não demonstrou diferença estatisticamente significativa, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3. Comparação entre a expressão do gene da pré-pró-endotelina-1 entre os grupos 1 e 2, nos diferentes tempos (basal, 30 minutos e três dias após reperusão)

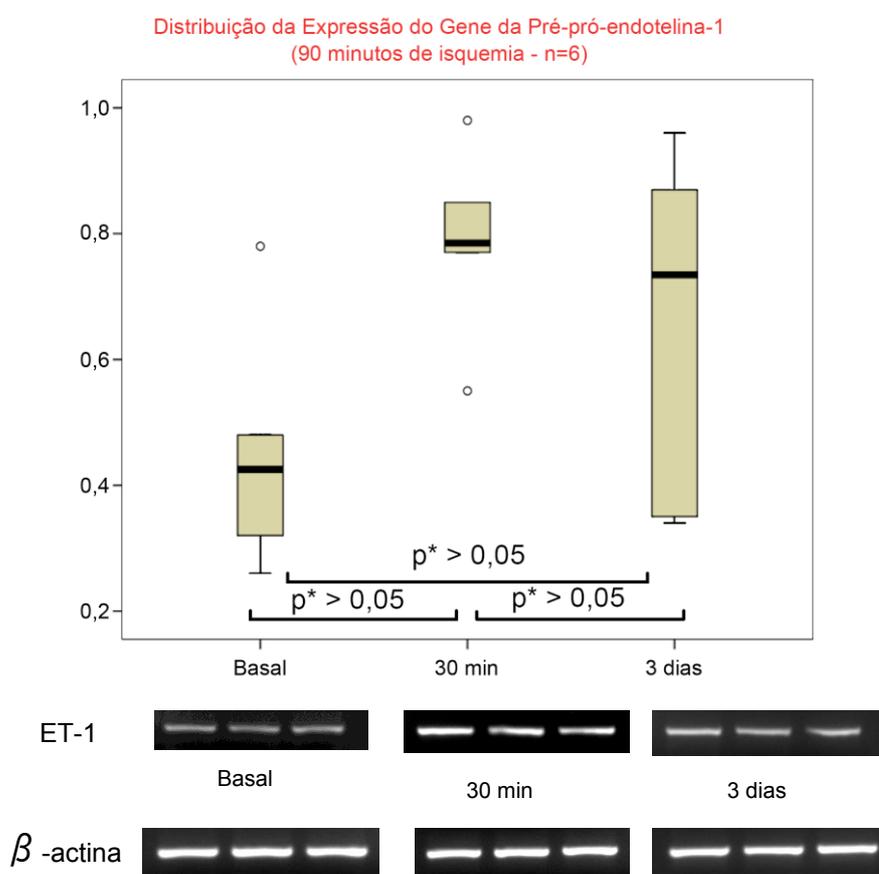
PRÉ-PRÓ- ENDOTELINA (n = 6)	GRUPO ¹	MEDIANA	VALOR MÁXIMO	VALOR MÍNIMO	MANN- WHITNEY (p)
BASAL	1	0,43	0,78	0,26	1,000
BASAL	2	0,4	0,48	0,32	
30 MINUTOS	1	0,79	0,98	0,55	0,054
30 MINUTOS	2	0,65	0,69	0,56	
3 DIAS	1	0,74	0,96	0,34	0,337
3 DIAS	2	0,55	0,61	0,49	

¹Grupo1 – 90 minutos de isquemia

Grupo2 – 180 minutos de isquemia

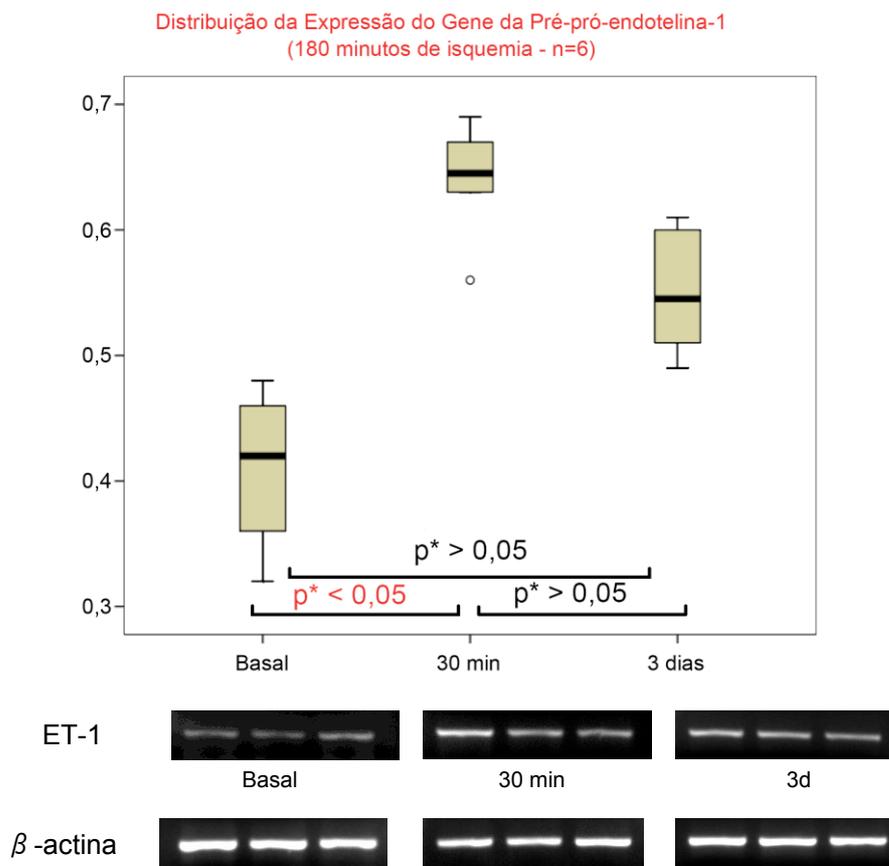
Comparação entre os fragmentos basal, 30 minutos e três dias após reperfusão em cada grupo separadamente

Houve, por outro lado, no grupo 2, diferença estatisticamente significativa entre os fragmentos basal e 30 minutos após reperfusão. Entre os demais fragmentos não foi possível detectar diferenças estatisticamente significantes, como mostrado nas figuras 16 e 17.



*Teste de Friedman, $p = 0,115$

Figura 16. Valores das densidades relativas de bandas do gene da pré-pró-endotelina-1 no grupo 1. Abaixo, estão apresentadas as bandas de RT-PCR do gene da pré-pró-endotelina-1 em triplicata e as bandas de β -actina, o controle, conforme metodologia descrita



*Teste *post hoc* de Dunn

Figura 17. Valores das densidades relativas de bandas do gene da pré-pró-endotelina-1 no grupo 2. Abaixo, estão apresentadas as bandas de RT-PCR do gene da pré-pró-endotelina-1 em triplicata e as bandas de β-actina, o controle, conforme metodologia descrita

Portanto, a expressão do gene da ET não variou significativamente entre os grupos 1 e 2. Foi detectada diferença estatisticamente significativa da mediana de expressão do gene entre os fragmentos obtidos 30 minutos e três dias após reperfusão no grupo submetido a 180 minutos de isquemia (grupo 2).

4.3.2 Expressão do gene da IL-6

Comparação entre os grupos 1 e 2

Houve diferença estatisticamente significativa quanto à expressão do gene da IL-6 entre os grupos 1 e 2 no fragmento obtido 30 minutos após reperfusão. Os dados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Comparação entre a expressão do gene da IL-6 entre os grupos 1 e 2, nos diferentes tempos (basal, 30 minutos e três dias após reperfusão)

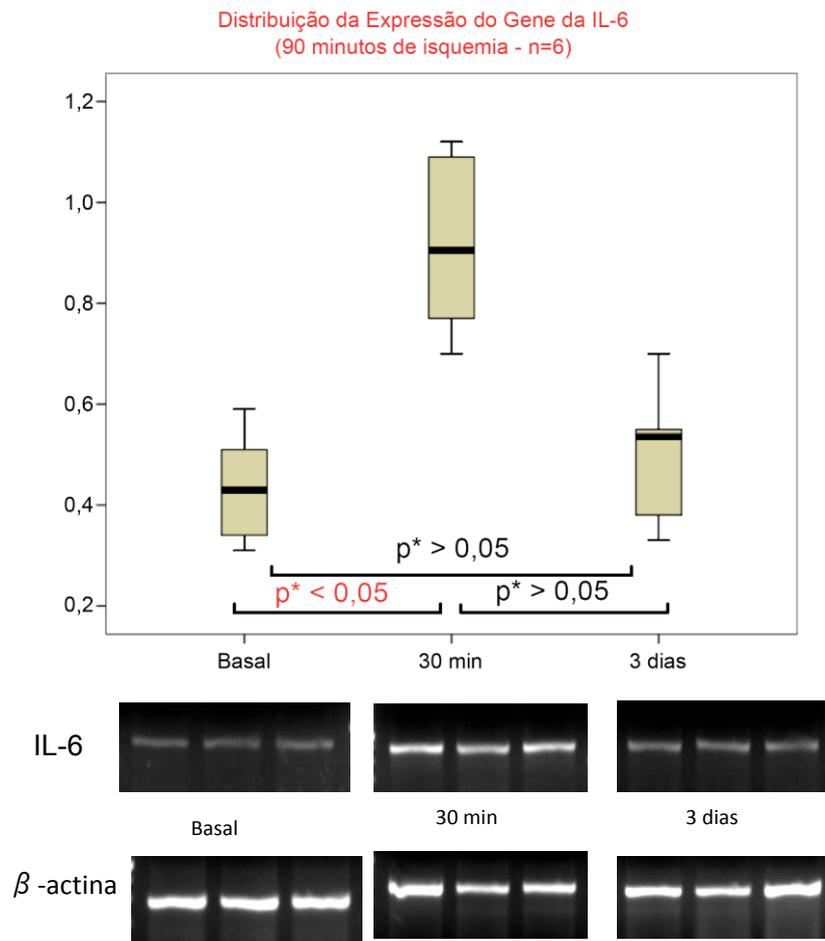
IL-6 (n = 6)	GRUPO ¹	MEDIANA	VALOR MÁXIMO	VALOR MÍNIMO	MANN- WHITNEY (p)
BASAL	1	0,43	0,59	0,31	0,199
BASAL	2	0,35	0,49	0,24	
30 MINUTOS	1	0,91	1,12	0,70	0,028
30 MINUTOS	2	0,72	0,76	0,70	
3 DIAS	1	0,54	0,70	0,33	0,631
3 DIAS	2	0,48	0,60	0,41	

¹Grupo1 – 90 minutos de isquemia

Grupo2 – 180 minutos de isquemia

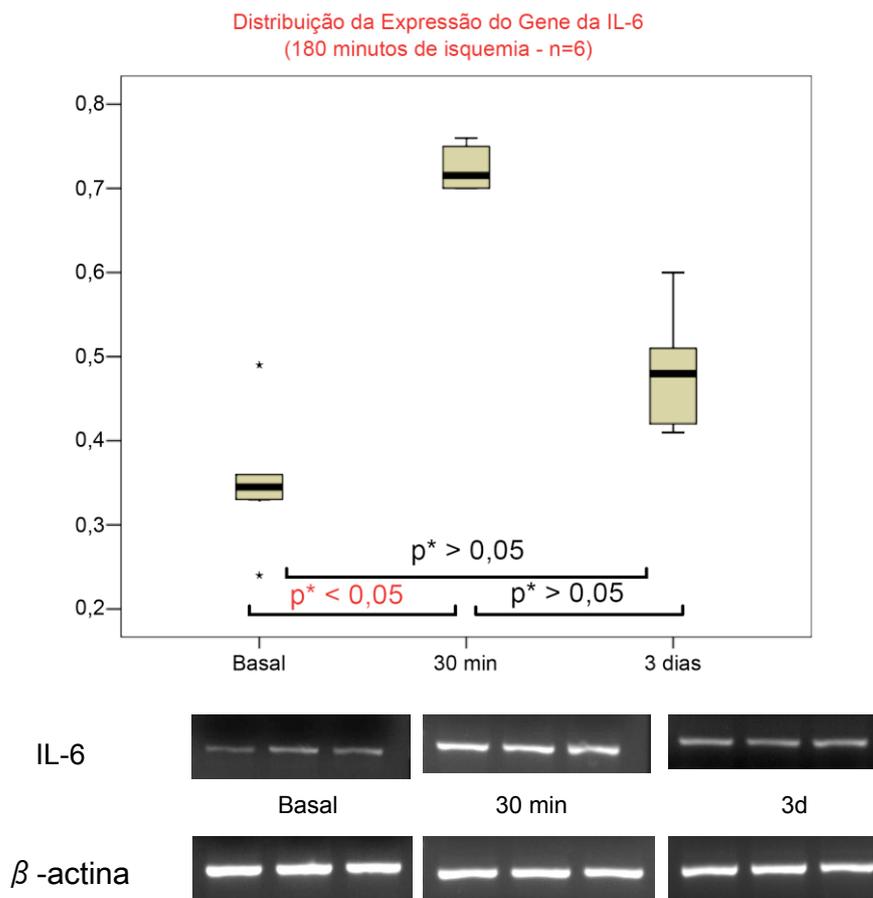
Comparação entre os fragmentos basal, 30 minutos e três dias após reperfusão em cada grupo separadamente

Foi detectada significância estatística na comparação entre as medianas de expressão do gene da IL-6 nos fragmentos basal e 30 minutos após a reperfusão nos dois grupos estudados (Figuras 18 e 19).



*Teste *post hoc* de Dunn

Figura 18. Valores das densidades relativas de bandas do gene da IL-6 no grupo 1. Abaixo, estão apresentadas as bandas de RT-PCR do gene da IL-6 em triplicata e as bandas de β -actina, o controle, conforme metodologia descrita



*Teste *post hoc* de Dunn

Figura 19. Valores das densidades relativas de bandas do gene da IL-6 no grupo 2. Abaixo, estão apresentadas as bandas de RT-PCR do gene da interleucina-6 em triplicata e as bandas de β -actina, o controle, conforme metodologia descrita

Ocorre, no intestino submetido à isquemia uma elevação dos níveis de expressão da IL-6 30 minutos após a reperfusão, com tendência ao retorno aos níveis basais três dias após o procedimento. O aumento da expressão do gene da IL-6 é significativamente menor no grupo submetido a maior tempo de isquemia (90 x 180 minutos).

4.3.3 Expressão do gene Bak

Comparação entre os grupos 1 e 2

A comparação entre os grupos está descrita na Tabela 5.

Tabela 5. Comparação entre a expressão do gene *Bak* entre os grupos 1 e 2, nos diferentes tempos (basal, 30 minutos e três dias após reperfusão)

<i>BAK</i> (n = 6)	GRUPO ¹	MEDIANA	VALOR MÁXIMO	VALOR MÍNIMO	MANN-WHITNEY (p)
BASAL	1	0,64	0,77	0,61	0,037
BASAL	2	0,54	0,66	0,46	
30 MINUTOS	1	0,68	0,76	0,60	0,030
30 MINUTOS	2	0,55	0,64	0,49	
3 DIAS	1	0,55	0,95	0,47	0,810
3 DIAS	2	0,57	0,67	0,42	

¹Grupo1 – 90 minutos de isquemia

Grupo2 – 180 minutos de isquemia

Foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre as medianas da expressão do gene pró-apoptótico, *Bak*, no fragmento basal e no fragmento 30 minutos após reperfusão entre os grupos 1 e 2. Nenhuma diferença entre medianas com significância estatística foi encontrada na comparação entre os fragmentos em cada grupo separadamente (teste de Friedman, $p = 0,607$).

4.3.4 Expressão do gene Bcl-XL

Comparação entre os grupos 1 e 2

A comparação entre os grupos 1 e 2 quanto à expressão do gene anti-apoptótico *Bcl-XL* mostrou diferenças estatisticamente significantes entre as medianas nos três fragmentos e está apresentada na Tabela 6.

Tabela 6. Comparação entre a expressão do gene Bak entre os grupos 1 e 2, nos diferentes tempos (basal, 30 minutos e três dias após reperfusão)

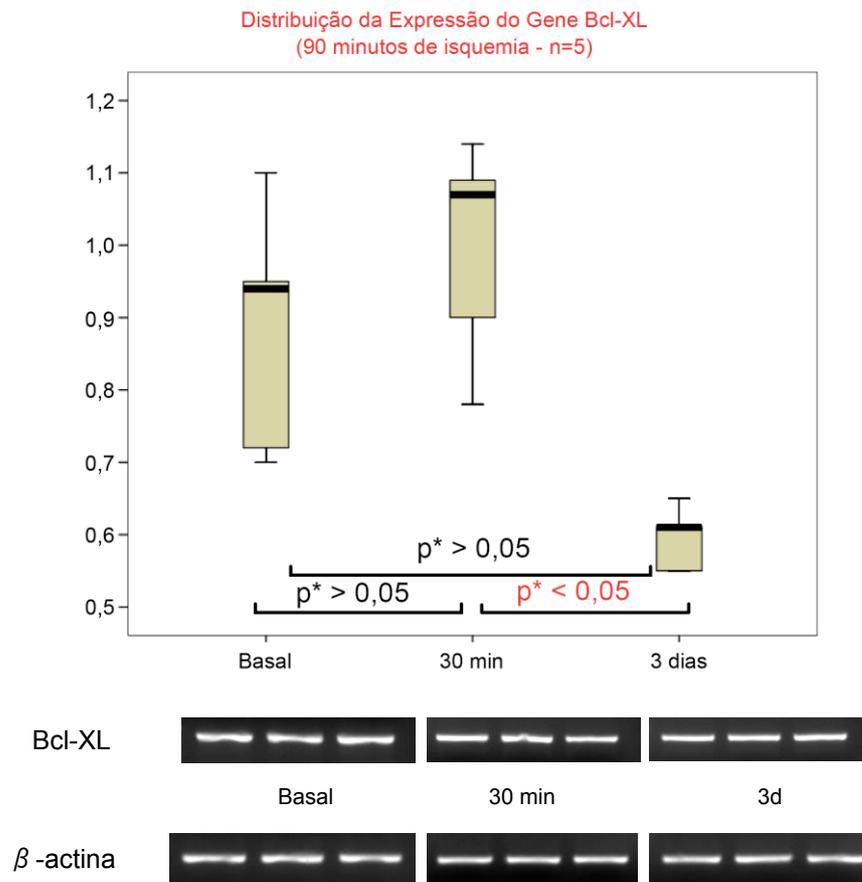
Bcl-XL	GRUPO ¹	MEDIANA	VALOR MÁXIMO	VALOR MÍNIMO	MANN-WHITNEY (p)
BASAL (n = 6)	1	0,95	1,15	0,70	0,016
BASAL (n = 6)	2	1,19	1,26	1,08	
30 MINUTOS (n = 6)	1	1,07	1,14	0,78	0,044
30 MINUTOS (n = 6)	2	1,18	1,30	1,06	
3 DIAS (n = 5)	1	0,61	0,65	0,55	0,006
3 DIAS (n = 6)	2	0,98	1,14	0,88	

¹Grupo1 – 90 minutos de isquemia

Grupo2 – 180 minutos de isquemia

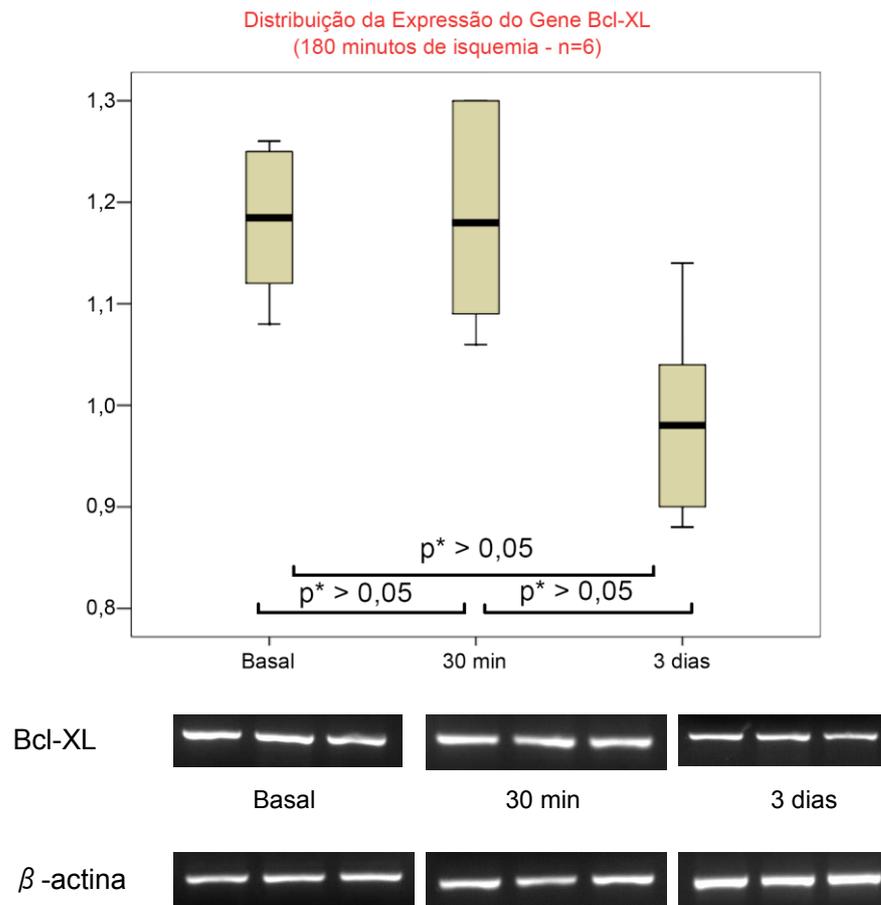
Comparação entre os fragmentos basal, 30 minutos e três dias após reperfusão em cada grupo separadamente

Foi detectada significância estatística entre as medianas das expressões do gene *Bcl-XL* 30 minutos e três dias após reperfusão no grupo 1 (90 minutos de isquemia). A expressão do gene *Bcl-XL* foi menor no terceiro dia após o procedimento (Figuras 20 e 21).



* Teste *post hoc* de Dunn

Figura 20. Valores das densidades relativas de bandas do gene anti-apoptótico *Bcl-XL* no grupo 1 (90 minutos de isquemia). Abaixo, estão apresentadas as bandas de RT-PCR do gene anti-apoptótico *Bcl-XL* em triplicata e as bandas de β -actina, o controle, conforme metodologia descrita



*Teste *post hoc* de Dunn

Figura 21. Valores das densidades relativas de bandas do gene anti-apoptótico *Bcl-XL* no grupo 2 (180 minutos de isquemia). Abaixo, estão apresentadas as bandas de RT-PCR do gene anti-apoptótico *Bcl-XL* em triplicata e as bandas de β -actina, o controle, conforme metodologia descrita

5 Discussão

O TI é atualmente aceito como alternativa terapêutica para a falência intestinal. Apesar da longa história, desde 1971, da FMUSP em pesquisa experimental em TI, objetivando o melhor entendimento do procedimento e a consequente melhora dos resultados e a sua aplicação clínica⁷⁸⁻⁸¹, do pioneirismo de Okumura no final da década de 1960, realizando o terceiro e o quarto TI do mundo no HC – FMUSP e de outros casos clínicos realizados já nos anos 2000, em São José do Rio Preto⁸² e na Santa Casa de Misericórdia de São Paulo⁸³, não existe no momento, no Brasil, nenhuma equipe de TI em atividade.

Dentre os pacientes submetidos a TI, segundo o Registro Internacional de Transplante de Intestino Delgado, pelo menos 60 % tem menos de 18 anos de idade e em 66 % destes, a etiologia da falência intestinal está relacionada a doença cirúrgica: gastrosquise, enterocolite necrosante, atresia intestinal, volvo do intestino médio, que necessitaram ressecções intestinais extensas. Portanto, o cirurgião pediatra está diretamente envolvido no tratamento dessas crianças e, no nosso meio, se depara com situações em que não consegue lhes proporcionar o tratamento definitivo, gerando ansiedade e frustração especialmente nos familiares, mas também, no médico responsável pelo tratamento do paciente.

A indicação do TI, atualmente, ainda é reservada aos pacientes que desenvolvem complicações relacionadas à NP: lesão hepática secundária à NP, episódios recorrentes de sepse, perda de acessos venosos centrais e, no caso das crianças, inadequado ganho pondo-estatural⁸⁴. A progressiva melhora nos cuidados

de pacientes com falência intestinal e a melhora dos resultados do TI fez com que o número de crianças encaminhadas a centros transplantadores tenha duplicado na última década⁸⁵.

Detalhada avaliação inicial, associada ao manejo adequado e individualizado da NP e enteral podem promover a adaptação intestinal e uma fração considerável de pacientes com diagnóstico inicial de falência intestinal acabam por prescindir do TI quando adequadamente acompanhados. Várias estratégias existem objetivando a indução da adaptação, mas muita controvérsia ainda persiste quanto ao tipo de dieta ideal, o volume e a velocidade de administração da mesma, a utilidade do uso de hormônios (hormônio do crescimento, por exemplo) ou de drogas (loperamida, octreotida, fibras solúveis, etc)⁸⁶. No entanto, essa discussão é complexa e foge ao escopo desta tese.

Segundo estatística, publicada pelo Grupo de Nutrição Artificial Domiciliar da Sociedade Européia para Nutrição Clínica e Metabolismo (*European Society for Clinical Nutrition and Metabolism – ESPEN – Home Artificial Nutrition – HAN – Working Group*), estima-se que a prevalência da necessidade de TI seja de 0,9 a 2/10⁶ indivíduos com idade \leq 18 anos⁸⁷. Se extrapolarmos esses dados para a população brasileira menor que 18 anos, que, segundo dados do Censo Demográfico de 2000 (www.ibge.gov.br), corresponde a 64.720.115 crianças, chegaremos à conclusão que entre 58 e 129 crianças brasileiras têm seu tratamento interrompido, uma vez que a possibilidade da realização do TI não lhes é oferecida.

A necessidade de proporcionar o TI para pacientes em falência intestinal aliada à experiência acumulada em um grupo que foi pioneiro na administração de NP a pacientes cirúrgicos^{88,89}, e na implantação de um programa de transplante

hepático, fez com que fosse idealizado, na nossa instituição, um modelo experimental capaz de proporcionar o treinamento técnico necessário a toda a equipe envolvida no procedimento cirúrgico (cirurgiões, anestesistas, enfermagem) mas, também, de permitir a realização de estudos que colaborassem para o melhor entendimento de alguns aspectos relacionados à lesão intestinal secundária à isquemia e reperfusão, no TI.

O TI envolve uma complexa sequência de eventos que se inicia no momento em que o paciente é encaminhado ao centro transplantador e constitui-se da avaliação inicial do candidato por equipe multidisciplinar, seguido de detalhada avaliação da função intestinal, de acordo com comprimento e qualidade do intestino remanescente, com conseqüente tomada de decisões quanto à indicação imediata do TI ou à opção pela manutenção do intestino nativo muitas vezes sendo necessárias medidas clínicas, tais como: a introdução e/ou a otimização da administração de dieta enteral e, algumas vezes até mesmo cirurgias, por exemplo, o fechamento de estomias, para que o paciente torne-se independente da NP. Apesar de a cirurgia do TI ser apenas mais um dos itens no processo, ela é repleta de detalhes e exige, para que seja atingido pleno sucesso, que a equipe envolvida esteja muito bem treinada e ciente das funções individuais.

Foi, portanto, com o objetivo de implantar o programa de TI no Instituto da Criança do HC – FMUSP, que se optou pela utilização de animais de médio porte, neste caso, o porco, seguindo a experiência prévia desse mesmo grupo quando da implantação do programa de transplante hepático.

A escolha do modelo experimental baseou-se nos princípios que regem a ética da experimentação animal, representados pelos três “R” da cirurgia em animais

descritos por Russell e Burch em 1959: na língua inglesa, “*replacement*”, “*reduction*” e “*refinement*”^{90,91,92}. Segundo esses princípios, o número de animais empregados deve ser reduzido (“*reduction*”) ao menor possível, com o intuito de limitar-se o sofrimento animal a um mínimo, mas, garantindo-se, ao mesmo tempo, que a capacidade do modelo experimental de produzir respostas às perguntas elaboradas não será comprometida, o que pode ser alcançado pela utilização do modelo experimental, da análise e do modelo estatístico mais precisos (“*refinement*”), maximizando-se, assim, a eficiência do experimento. Além disso, apesar de simularem mais fielmente os obstáculos encontrados na prática clínica, a utilização de animais de maior porte implica um maior custo financeiro e maior dificuldade de manejo durante o período PO.

Esses motivos fizeram com que o número de experimentos fosse reduzido, abolindo-se os animais controle e utilizando-se o intestino do próprio animal doador no momento da abertura da cavidade abdominal como o controle ou como o valor basal das avaliações histológicas, imunoistoquímicas e moleculares.

Só não foi possível substituímos (“*replacement*”) o animal utilizado, uma vez que um dos objetivos primários do experimento foi o de treinar eficientemente a equipe para o procedimento.

Como descrito no projeto piloto, inicialmente, pretendia-se estudar a RCA. Entretanto, esta começava a manifestar-se clínica e histologicamente somente por volta do final da primeira semana após o transplante. A manutenção dos animais por tanto tempo implicava custos financeiros e incrementos no sofrimento do animal que se julgou serem inapropriados para as condições disponíveis na Unidade de Cirurgia Experimental do Instituto da Criança do HC – FMUSP. Outras dificuldades, com

consequências em termos de custos e sacrifícios animais impuseram-se também ao modelo inicialmente idealizado. A realização de biópsias do intestino transplantado por via endoscópica, por exemplo, mostrou-se mais de uma vez inadequada para a obtenção de material apropriado para os diversos estudos propostos. Por isso, a coleta de material passou a ser feita pela via laparotômica, seguida de sacrifício do animal envolvido. Caso o objetivo final fosse o estudo da RCA, mais animais seriam necessários para permitir a obtenção de fragmentos intestinais nos tempos intermediários.

Os tempos de isquemia estudados foram, também, adequados às condições do laboratório, uma vez que o procedimento é demorado e compõe-se de várias etapas: iniciava-se a cirurgia do doador pela manhã e o fechamento da parede abdominal do animal receptor ocorria no início da noite, impossibilitando o estudo de tempos maiores de isquemia. Por outro lado, os períodos de isquemia estudados mostraram-se compatíveis com outros estudos envolvendo porcos e TI^{93,94}.

A escolha da solução de preservação por fim utilizada teve como objetivo mimetizar as condições reais de captação intestinal ao mesmo tempo que permitisse o desenvolvimento da LIR para um tempo de isquemia mais curto, além de minimizar os custos do experimento. A solução de Euro Collins foi a escolhida por ser uma solução classicamente utilizada na prática clínica, principalmente, em órgãos como o rim, mas com capacidade de preservação por tempo mais limitado que a solução UW e menor custo.

A LIR vem sendo implicada como uma das causas dos piores resultados do TI quando comparado aos demais órgãos sólidos, apresentando, caracteristicamente uma diminuição progressiva ao longo do tempo da sobrevida tanto do paciente

quanto do enxerto⁹⁵. A identificação de fatores que contribuem para essa mortalidade persistente após o TI com consequente adoção de medidas terapêuticas ou profiláticas pode promover a melhora dos resultados.

Os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da LIR são comuns a várias condições clínicas, tais como: o infarto agudo do miocárdio, o acidente vascular cerebral, o transplante de órgãos sólidos, a lesão de órgãos abdominais após trauma fechado, o choque hipovolêmico e cirurgias de aorta abdominal^{96,97,98}. Em todas elas, a um período de diminuição ou interrupção do fluxo sanguíneo segue-se o seu restabelecimento e, dependendo da suscetibilidade individual de cada órgão, estabelecem-se as lesões secundárias. Os componentes principais da LIR compreendem a ativação de células envolvidas no processo inflamatório e consequente liberação de citocinas, expressão de moléculas de adesão e disfunção da microcirculação. No caso do fígado, por exemplo, os hepatócitos e as células sinusoidais são as principais vítimas da lesão isquêmica, sendo que as últimas são consideradas peças-chave no desenvolvimento da LIR. A disfunção das células sinusoidais tem como consequência o mau funcionamento da microcirculação no momento da reperfusão, culminando em lesão hepatocitária e disfunção do órgão⁹⁹.

Modelos animais de IR do miocárdio indicam que até 50 % do tamanho da área infartada pode estar relacionado à agressão causada pela reperfusão adicionada à lesão isquêmica inicial. Propõe-se que o mau funcionamento celular, a apoptose e a necrose promovam o fenômeno do não-refluxo, arritmias e a morte de uma quantidade maior de células miocárdicas⁹⁹.

A grande sensibilidade do intestino à LIR tem sido apontada como co-responsável pela disfunção precoce do enxerto, pelo desenvolvimento de RCA, uma

das principais causas de perda do enxerto, e pelas alterações crônicas detectadas nos órgãos no longo prazo^{100,101}.

A LIR intestinal é um fenômeno sistêmico e resulta em translocação bacteriana, endotoxemia e lesão hepática aguda, podendo desencadear até mesmo a síndrome do desconforto respiratório agudo e a insuficiência de múltiplos órgãos. Ela inicia-se com a depleção local de compostos energéticos ricos em fosfato (ATP), impossibilitando o funcionamento das bombas celulares de transporte de íons, que provoca o influxo de íons e água, culminando com edema celular, em especial do endotélio. A hemoconcentração e a acidose locais resultantes, alteram as propriedades das membranas das células sanguíneas particularmente dos leucócitos, tornando-as mais rígidas, o que, em associação ao edema endotelial culminam com a obstrução do fluxo capilar. Com a reperfusão, formam-se radicais livres de oxigênio, que, atuando em nível molecular, ativam leucócitos e polimorfonucleares. Essas células aderem, então, ao endotélio e liberam citocinas e moléculas que intensificam o processo inflamatório deflagrado.

Os linfócitos fazem parte do sistema de vigilância do organismo e circulam por todo o corpo, entram nos tecidos e retornam à corrente sanguínea pelos linfáticos. As citocinas liberadas no processo inflamatório gerado pela LIR altera a relação dessas células com o endotélio do órgão submetido à lesão, diminuindo a seletividade da migração dos leucócitos, permitindo, assim, um maior influxo de linfócitos T ao tecido agredido. Estas células acabam por ter um maior contato com as células do órgão submetido à agressão isquêmica e, nos casos de transplante de órgãos, terminam por desencadear uma reação imunológica que resulta em episódios de RCA. Citocinas envolvidas na fase aguda da inflamação, tais como IL-1, TNF- α ,

IL-4 e INF- γ parecem estar envolvidas na mudança de comportamento dos linfócitos em relação ao órgão afetado¹⁰². A inibição do processo inflamatório deflagrado pela LIR poderia, ao menos em tese, diminuir a estimulação linfocitária e, portanto, além de diminuir a lesão inicial, minimizar a resposta imune subsequente.

Iniciou-se a avaliação das consequências da LIR nos fragmentos intestinais obtidos nos dois grupos pela análise histológica pela coloração da HE. Apesar de terem sido claramente identificadas inúmeras alterações, não foi possível detectar diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. Esta ausência de diferença pode estar relacionada à multiplicidade de alterações detectadas (vide seção ANEXOS) e ao número de animais envolvidos no experimento, que apesar de compatível com procedimentos descritos na literatura, é reduzido^{93,103,104}.

Tanto a IL-6 quanto a ET são citocinas produzidas pelo endotélio e estão envolvidas no desenvolvimento da LIR. A ET é um potente vasoconstritor e vários estudos demonstram seu envolvimento na LIR em vários órgãos. A produção de ET-1 pela mucosa intestinal leva a adesão leucocitária e redução do fluxo dos eritrócitos na microcirculação intestinal, que, por sua vez, estão ligados à redução da síntese do óxido nítrico, um potente vasodilatador.

A caracterização mais precisa da participação das diversas citocinas envolvidas no desenvolvimento da LIR pode orientar a adoção de medidas ou a utilização de drogas com o objetivo de minimizar a lesão da mucosa intestinal. Esse assunto já foi tema de vários estudos, sendo que cada um enfoca um aspecto dessa intrincada rede de estimulações e inibições^{102,103,105}, mas muitos detalhes ainda necessitam ser esclarecidos.

A escolha das citocinas estudadas deveu-se, em primeiro lugar, a seu comprovado envolvimento nos processos relacionados à isquemia e reperfusão de órgãos^{50-52,60-62} e à disponibilidade, na literatura, da sequência de nucleotídeos que compõem seus genes na raça porcina.

A IL-6 é uma citocina bastante interessante, uma vez que a caracterização mais precisa da expressão na LIR no nosso modelo poderia auxiliar na elucidação seu papel no processo inflamatório, que é ainda indefinida: alguns trabalhos demonstram atividade pró-inflamatória, enquanto que outros provam que a sua presença promove atenuação da inflamação.

No modelo experimental descrito, as citocinas estudadas (IL-6 e ET-1) mostraram-se envolvidas nos estádios iniciais da LIR, retornando aos níveis basais três dias após o procedimento. Conclui-se, portanto, que quaisquer intervenções com o intuito de minimizar a lesão intestinal causada pela isquemia, devem ocorrer precocemente ou até mesmo profilaticamente, no momento da captação do órgão.

No caso da ET-1, somente o grupo submetido a maior tempo de isquemia mostrou aumento significativo na sua expressão, o que pode significar que somente estímulo agressor mais intenso seja capaz de envolvê-la no desenvolvimento das lesões de mucosa secundárias à isquemia.

A apoptose das células epiteliais foi escolhida como foco de atenção especial no estudo, uma vez que estas constituem o principal componente da barreira mucosa e a apoptose é o principal modo de morte celular associado à LIR intestinal¹⁰⁶. A sua caracterização histopatológica e por biologia molecular poderia auxiliar na indicação precisa do momento ideal para a utilização de tratamento anti-apoptótico. Os resultados obtidos demonstraram uma diminuição na expressão do gene anti-apoptótico *Bcl-XL*

e aumento no número de células epiteliais em processo de morte por apoptose nos intestinos submetidos a menor tempo de isquemia (90 minutos), três dias após o procedimento, enquanto que, curiosamente, nos intestinos submetidos a maior tempo de isquemia (180 minutos) essas alterações não foram significantes estatisticamente. É possível que um tempo maior de isquemia seja capaz de deflagrar mecanismos de defesa que uma agressão muito leve não o faça, justificando a maior significância nas alterações encontradas nos intestinos submetidos a menor agressão. Da mesma forma, os resultados obtidos para a expressão do gene da IL-6 mostraram elevação nos dois grupos, porém, com níveis significativamente maiores no grupo submetido a menor isquemia (vide Tabela 4). A comparação entre os grupos quanto à atividade da MPO, apesar de não ter atingido diferença estatisticamente significativa, mostrou uma tendência a maior infiltração por neutrófilos nos grupo 1, com 90 minutos de isquemia (vide Tabela 1).

Uma explicação para esse fato pode estar relacionada a maior resistência à isquemia, conferida a diversos órgãos quando submetidos a pré-condicionamento.

O pré-condicionamento isquêmico é um fenômeno através do qual os órgãos mostram-se mais resistentes à LIR quando submetidos previamente a períodos curtos de isquemia. O pré-condicionamento foi demonstrado pela primeira vez em 1986 em estudo envolvendo LIR infringida ao miocárdio¹⁰⁸. A partir de então, diversos estudos demonstraram o mesmo fenômeno em diversos outros órgãos¹⁰⁹⁻¹¹⁴, inclusive no intestino¹¹⁵.

O mecanismo pelo qual uma agressão isquêmica prévia protege o órgão de uma agressão mais intensa posterior ainda não é bem estabelecido, mas o pré-condicionamento parece estar associado a uma redução no estresse oxidativo, na

apoptose¹¹⁶, na adesão leucocitária¹¹⁷ e na conversão de xantina desidrogenase em xantina oxidase. Os principais efetores parecem ser a adenosina e o óxido nítrico, em associação com quinases intracelulares^{98,99}.

Abre-se, assim, um leque de atrativas investigações futuras envolvendo a expressão dos genes das citocinas estudadas, mas em animais de menor porte, permitindo a realização de um maior número de experimentos e a obtenção de fragmentos intestinais a intervalos menores, levando à caracterização mais precisa do comportamento dessas moléculas de interação celular.

O pré-condicionamento isquêmico, também, merece foco especial na elaboração de futuros modelos experimentais para sua melhor caracterização e identificação de mecanismos celulares e moleculares envolvidos, devido ao seu comprovado efeito benéfico na resistência à isquemia em órgãos como o coração, o rim e o fígado, e à facilidade de aplicação na prática clínica.

6 Conclusões

No modelo experimental de transplante de intestino em porcos jovens escolhido para estudo da LIR:

1. A avaliação histológica simples, através da coloração de HE, não se mostrou adequada para a gradação da LIR nos tempos estudados;
2. A infiltração da mucosa intestinal por neutrófilos, evidenciada pela análise imunoistoquímica, tende a persistir até o terceiro dia de pós-operatório nos intestinos submetidos a maior tempo de isquemia;
3. A agressão imposta pela LIR à mucosa intestinal levou a aumento significativo de células epiteliais em apoptose no grupo submetido a menor tempo de isquemia;
4. A avaliação da expressão dos genes da ET demonstrou ser necessário maior tempo de isquemia para que ocorra o envolvimento desta citocina na LIR e que essa participação ocorre logo após a reperfusão, tendendo a normalizar-se ao final do período estudado;
5. A expressão do gene da IL-6 na LIR apresenta-se aumentada em relação à sua expressão basal, porém, ela mostrou-se significativamente menor no grupo submetido a maior tempo de isquemia;

6. A LIR desencadeia alteração no equilíbrio da expressão de genes que regulam a apoptose, com tendência a aumentar a expressão do gene pró-apoptótico (*Bak*) e inibir a expressão do gene anti-apoptótico (*Bcl-XL*) estudados, podendo aumentar o índice de apoptose com conseqüente lesão da barreira mucosa do intestino. Paradoxalmente, no presente modelo, o menor tempo de isquemia mostrou-se estímulo com potencial para causar maior lesão intestinal, uma vez que o gene anti-apoptótico teve sua expressão significativamente inibida no grupo 1, 3 dias após o procedimento.

7 Anexos

Anexo A. Composição das soluções de preservação utilizadas no projeto piloto

	<i>Euro Collins</i>	Solução UW	Solução de Celsior
Glicose (mmol/L)	198	-	-
Lactobionato(mmol/L)	-	100	80
Rafinose(mmol/L)	-	30	-
Manitol(mmol/L)	-	-	60
Glutamato(mmol/L)	-	-	20
Tampão de fosfatos(mmol/L)	100	25	-
Tampão de bicarbonato(mmol/L)	10	-	-
Tampão de histidina(mmol/L)	-	-	30
Glutathiona (adenosina/alopurinol) (mmol/L)	-	2 (5/1)	3
Colóide (amido hidroxietílico) (g)	-	50	-
Na(mmol/L)	10	30	100
K(mmol/L)	115	120	15
Mg(mmol/L)	-	5	13
Ca(mmol/L)	-	-	0,25
pH	7,0	7,4	7,3
Osmolaridade (mOsm/L)	406	320	360

ANEXO B. Alterações histológicas detectadas à microscopia óptica em lâminas coradas com HE. As alterações foram graduadas de 0 a 4, sendo que 0 a 1 foram consideradas leves/moderadas e de 2 a 4, moderadas/graves. Grupo 1 (90 minutos de isquemia) em preto e grupo 2 (180 minutos de isquemia) em vermelho. Os dados correspondem aos fragmentos intestinais obtidos 30 minutos após reperfusão

Animal	22	23	24	26	27	28	29	30	32	33	34	36	37	38	40	41	42	43	44	45
Edema	1	2	3	2	2	1	1	1	2	1	2	2	1	1	3	2	2	2	1	2
Descamação do epitélio	2	2	2	0	4	0	4	0	3	1	2	0	1	0	3	1	3	0	4	1
Congestão capilar	2	1	3	2	2	0	4	0	3	1	1	0	0	0	2	1	2	1	1	2
Infiltração neutrofílica	2	1	1	1	2	2	3	1	1	1	1	2	1	1	2	1	2	0	3	1
Depleção de céls caliciformes	1	1	1	0	2	3	3	2	1	1	1	0	0	0	2	1	1	1	3	1
Perda da arquitetura dos vilos	0	1	1	0	4	0	4	3	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	3	0
Perda da arquitetura das criptas	0	0	0	0	2	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Infarto transmural	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemorragia	0	0	2	0	3	0	1	0	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	2	0
Hemosiderina	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rejeição	n/a																			

n/a = não se aplica

ANEXO C. Alterações histológicas detectadas à microscopia óptica em lâminas coradas com HE. As alterações foram graduadas de 0 a 4, sendo que 0 a 1 foram consideradas leves/moderadas e de 2 a 4, moderadas/graves. Grupo 1 (90 minutos de isquemia) em preto e grupo 2 (180 minutos de isquemia) em vermelho. Os dados correspondem aos fragmentos intestinais obtidos 30 dias após o procedimento

Animal	22	23	24	26	27	28	29	30	32	33	34	36	37	38	40	41	42	43	44	45
Edema	-	2	3	2	2	-	2	-	2	1	1	-	1	1	1	1	2	2	1	2
Descamação do epitélio	-	1	0	0	4	-	1	-	4	0	1	-	1	3	0	3	0	0	0	0
Congestão capilar	-	2	2	1	4	-	2	-	1	1	2	-	1	1	0	2	1	1	1	1
Infiltração neutrofílica	-	1	2	1	2	-	1	-	1	1	1	-	1	3	1	1	1	3	1	1
Depleção de céls caliciformes	-	2	1	1	2	-	1	-	2	0	1	-	2	2	0	1	0	0	0	0
Perda da arquitetura dos vilos	-	1	2	2	4	-	1	-	3	0	2	-	0	2	0	3	0	0	0	0
Perda da arquitetura das criptas	-	0	0	0	3	-	0	-	2	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0
Infarto transmural	-	0	0	0	0	-	0	-	0	0	0	-	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemorragia	-	0	2	0	4	-	1	-	2	1	1	-	0	1	0	0	0	0	0	0
Hemosiderina	-	0	0	0	0	-	0	-	0	0	3	-	0	0	0	0	0	0	0	0
Rejeição	-	0	0	mod	0	-	0	-	0	0	mod	-	mod	leve	0	0	0	mod	0	0

mod = moderada

Anexo D. Valores individuais da contagem de células positivas para MPO. Grupo 1 (90 minutos de isquemia) em preto e grupo 2 (180 minutos de isquemia) em vermelho. Os dados correspondem aos fragmentos intestinais obtidos no momento da laparotomia (basal)

Animal	Área(μm^2)	Células positivas	Cél $\times 10^4/\mu\text{m}^2$
22	338648	13	0,38
23	338648	40	1,2
24	338648	22	0,6
26	338648	10	0,3
27	338648	8	0,2
28	338648	39	1,1
29	338648	25	0,7
30	338648	26	0,8
32	338648	31	0,9
33	338648	24	0,7
34	338648	31	0,9
36	338648	14	0,4
37	338648	14	0,4
38	338648	29	0,8
40	338648	11	0,3
41	338648	24	0,7
42	338648	13	0,4
43	338648	22	0,6
44	338648	7	0,2
45	338648	16	0,5

Anexo E. Valores individuais da contagem de células positivas para MPO. Grupo 1 (90 minutos de isquemia) em preto e grupo 2 (180 minutos de isquemia) em vermelho. Os dados correspondem aos fragmentos intestinais obtidos 30 minutos após a reperfusão

Animal	Área(μm^2)	Células positivas	Cél $\times 10^4/\mu\text{m}^2$
22	338648	71	2,1
23	338648	106	3,1
24	338648	46	1,3
26	338648	81	2,3
27	338648	107	3,1
28	338648	55	1,6
29	338648	86	2,5
30	338648	42	1,2
32	338648	62	1,8
33	338648	68	2,0
34	338648	42	1,2
36	338648	27	0,8
37	338648	35	1,0
38	338648	77	2,2
40	338648	61	1,8
41	338648	54	1,5
42	338648	22	0,6
43	338648	40	1,2
44	338648	34	1,0
45	338648	42	1,2

Anexo F. Valores individuais da contagem de células positivas para MPO. Grupo 1 (90 minutos de isquemia) em preto e grupo 2 (180 minutos de isquemia) em vermelho. Os dados correspondem aos fragmentos intestinais obtidos 3 dias após o procedimento

Animal	Área(μm^2)	Células positivas	Cél $\times 10^{-4}/\mu\text{m}^2$
22	-	-	-
23	338648	53	1,6
24	338648	43	1,3
26	338648	35	1,0
27	338648	50	1,5
28	-	-	-
29	203188,8	31	1,5
30	-	-	-
32	338648	52	1,5
33	338648	59	1,7
34	338648	63	1,8
36	-	-	-
37	338648	38	1,1
38	338648	46	1,3
40	338648	45	1,3
41	338648	56	1,7
42	338648	37	1,1
43	338648	57	1,7
44	338648	56	1,6
45	338648	81	2,3

Anexo G. Valores individuais da contagem de células em apoptose. Grupo 1 (90 minutos de isquemia) em preto e grupo 2 (180 minutos de isquemia) em vermelho. Os dados correspondem aos fragmentos intestinais obtidos no momento da laparotomia (basal)

Animal	Área total (μm^2)	Cel x $10^{-6}/\mu\text{m}^2$
28	525620,9	11,4
29	742806,5	14,8
30	567356,1	8,8
32	606987,2	3,3
33	662807	0
34	719891,2	4,2
36	637524,3	0
37	714864,1	5,6
38	696217,5	1,4
40	611048,4	9,8
41	684528,9	7,3
42	554108,4	1,8
44	658001,6	24,3

Anexo H. Valores individuais da contagem de células em apoptose. Grupo 1 (90 minutos de isquemia) em preto e grupo 2 (180 minutos de isquemia) em vermelho. Os dados correspondem aos fragmentos intestinais obtidos 30 minutos após a reperfusão

Animal	Área total (μm^2)	Cel x $10^{-6}/\mu\text{m}^2$
28	499483,8	18,0
29	370921,3	2,6
30	441512,7	15,8
32	437910,4	0
33	472584,9	2,1
34	431287,4	37,1
36	577827,7	1,7
37	570007,2	1,8
38	581832,3	13,7
40	528911,9	1,9
41	540315,7	12,9
42	663291,9	7,5
44	608775,4	44,3

Anexo I. Valores individuais da contagem de células em apoptose. Grupo 1 (90 minutos de isquemia) em preto e grupo 2 (180 minutos de isquemia) em vermelho. Os dados correspondem aos fragmentos intestinais obtidos 3 dias após o procedimento

Animal	Área total (μm^2)	Cel x $10^{-6}/\mu\text{m}^2$
28	-	-
29	349813,4	17,2
30	-	-
32	475088,0	107,3
33	669665,5	19,4
34	426715,5	39,8
36	-	-
37	571982,7	7,0
38	476904,3	2,1
40	587170,0	28,9
41	637911,0	18,8
42	546959,6	38,4
44	613009,5	11,4

Anexo J. Valores individuais das densidades relativas das bandas do gene da pré-pró-ET-1. Grupo 1 (90 minutos de isquemia) em preto e grupo 2 (180 minutos de isquemia) em vermelho

Animal	Pré-pró-ET basal	Pré-pró-ET 30 min após reperusão	Pré-pró-ET 3 d após reperusão
22	0.32	0.78	0.96
27	0.41	0.55	0.85
32	0.26	0.98	0.35
33	0.48	0.79	0.87
34	0.44	0.77	0.34
36	0.78	0.85	0.62
37	0.48	0.66	0.51
38	0.39	0.69	0.49
40	0.45	0.67	0.52
41	0.32	0.63	0.61
43	0.46	0.63	0.57
44	0.36	0.56	0.60

Anexo K. Valores individuais das densidades relativas das bandas do gene da IL-6. Grupo 1 (90 minutos de isquemia) em preto e grupo 2 (180 minutos de isquemia) em vermelho.

Animal	IL-6 basal	IL-6 30 min após reperfusão	IL-6 3 d após reperfusão
22	0.39	0.83	0.53
27	0.47	1.09	0.7
32	0.31	0.98	0.38
33	0.51	1.12	0.54
34	0.34	0.7	0.33
36	0.59	0.77	0.55
37	0.24	0.70	0.50
38	0.33	0.70	0.41
40	0.33	0.73	0.42
41	0.36	0.75	0.51
43	0.49	0.76	0.60
44	0.36	0.7	0.46

Anexo L. Valores individuais das densidades relativas das bandas do gene *Bcl-XL*. Grupo 1 (90 minutos de isquemia) em preto e grupo 2 (180 minutos de isquemia) em vermelho.

Animal	<i>Bcl-XL</i> basal	<i>Bcl-XL</i> 30 min após reperusão	<i>Bcl-XL</i> 3 d após reperusão
22	0.95	0.9	0.65
27	1.1	1.07	0.61
32	0.94	1.09	0.55
33	0.72	0.78	0.55
34	0.7	1.14	0.61
36	1.15	1.07	-
37	1.25	1.15	0.88
38	1.26	1.21	0.99
40	1.08	1.09	1.04
41	1.16	1.06	0.9
43	1.12	1.3	1.14
44	1.21	1.3	0.97

Anexo M. Valores individuais das densidades relativas das bandas do gene *Bak*. Grupo 1 (90 minutos de isquemia) em preto e grupo 2 (180 minutos de isquemia) em vermelho.

Animal	<i>Bak</i> basal	<i>Bak</i> 30 min após reperfusão	<i>Bak</i> 3 d após reperfusão
22	0.64	0.60	0.54
27	0.63	0.62	0.47
32	0.61	0.64	0.52
33	0.77	0.72	0.56
34	0.65	0.76	0.95
36	0.61	0.74	0.93
37	0.46	0.5	0.42
38	0.55	0.51	0.56
40	0.66	0.49	0.51
41	0.58	0.63	0.67
43	0.53	0.64	0.58
44	0.51	0.58	0.57

8 Referências

1. Hossein S. Organ transplantation: from myth to reality. *J Invest Surg.* 2001;14:135-8.
2. Lillehei RC, Goott B, Miller FA. The physiological response of the small bowel of the dog to ischemia including prolonged in vitro preservation of the bowel with successful replacement and survival. *Ann Surg.* 1959;150:543.
3. Lillehei RC, Goott B, Miller FA. Homografts of the small bowel. *Surg Forum* 1960;10:197-201.
4. Starzl TE, Kaupp HA Jr. Mass homotransplantation of abdominal organs in dogs. *Surg Forum.* 1960;11:28-30.
5. Okumura M, Mester M. The coming of age of small bowel transplantation: a historical prespective. *Transpl Proc.* 1992;24:1241-2.
6. Okumura M, Fujimura I, Ferrari A, Nakiri K, Lemos PCP, Andréa EA, Bahdur R, Marek SR, Yasbek Neto J, Posso BJM, Fonseca AM, Iriya K, Antonascio F, Faria JF, Magaldi JB, Paula W, Raia AA. Transplante de intestino delgado. *Ver Hosp Clin Fac Med São Paulo.* 1969;24:39-54.
7. Starzl TE, Rowe MI, Todo S, et al. Transplantation of multiple abdominal viscera. *JAMA.*1989;261:1449-57.
8. Williams JW, Sankary HN, Foster PF, Loew JM, Goldman GM. Splanchnic transplantation. An approach to the infant dependent on parenteral nutrition who develops irreversible liver disease. *JAMA.* 1989;261:1458-62.
9. Ruemmele FM, Sauvat F, Colomb V. Seventeen years after successful small bowel transplantation: long term graft acceptance without immune tolerance. *Gut.* 2006;55:903.
10. Mayer L. Mucosal immunity and gastrointestinal antigen processing. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;30:Suppl:S4-S12.
11. Iwaki Y, Starzl TE, Yagihashi A, et al. Replacement of donor lymphoid tissue in small-bowel transplants. *Lancet.* 1991;337:818-9.
12. Newell KA. Transplantation of the intestine: is it truly different? *Am J Transplant.* 2003;3:1-2.
13. Fishbein,T. Intestinal Transplantation. *New Engl J Med.* 2009;361:998-1008.

14. Avitzur Y, Grant D. Intestine transplantation in children: update 2010. *Ped Clin N Am.* 2010;57:415-31
15. Schonder KS, Mazariegos GV, Weber RJ. Adverse effects of immunosuppression in pediatric solid organ transplantation. *Ped Drugs.* 2010; 12:35-49.
16. Grant W, Botha J, Mercer D. 19 years of experience with intestinal transplantation at a single institution. In: *11th International Small Bowel Transplant Symposium.* Bologna, Italy; Sep. 9-12, 2009. p. 94.
17. Gupte GL, Sharif K, Mayer AD. Strategies, complications and learning experiences of a national intestinal transplant programme (1993–2009). In: *11th International Small Bowel Transplant Symposium.* Bologna, Italy; Sep. 9-12, 2009. p. 53.
18. Churchill TA. Preserving the gut: give it what it wants. *Transplantation.* 2010; 89:274-6
19. Newell KA, Fishbein TM. Experimental models of small bowel transplantation. *Curr Opin Organ Transpl.* 2003; 8:209-16.
20. Illyes G, Hamar J. Sequence of morphological alterations in a small intestinal ischaemia/reperfusion model of the anesthetized rat. A light microscopy study. *Int J Exp Pathol.* 1992;73:161-72.
21. Kong SE, Blennerhassett LR, Heel KA, McCauley RD, Hall JC. Ischaemia-reperfusion injury to the intestine. *Aust N Z J Surg.* 1998;68:554-61.
22. Takeyoshi I, Zhang S, Nakamura K, Ikoma A, Zhu Y, Starzl TE, Todo S. Effect of ischemia on the canine large bowel: A comparison with the small intestine. *J Surg Res.* 1996;62:41-8.
23. Hinnebusch BF, Ma Q, Henderson JW, Siddique A, Archer SY, Hodin RA: Enterocyte response to ischemia is dependent on differentiation state. *J Gastroint Surg.* 2002;6:403-9.
24. Bohlen HG. Integration of intestinal structure, function, and microvascular regulation. *Microcirculation.* 1998;5:27-37.
25. Fröjse R, Lehtipalo S, Bergstrand U, Biber B, Winsö O, Johansson G, Arnerlöv C. Local metabolic effects of dopexamine on the intestine during mesenteric hypoperfusion. *Shock.* 2004;21:241-7.
26. Figueiredo LFP, Silva E, Cruz Jr RJ, Silva MR. Gas tonometry for evaluation of gastrointestinal mucosal perfusion. Experimental models of trauma, shock and complex surgical maneuvers – part I. *Acta Cir Bras.* 2002;17:281-8.

27. Nakao A, Kimizuka K, Stolz DB, Neto JS, Kaizu T, Choi AM, Uchiyama T, Zuckerbraun BS, Nalesnik MA, Otterbein LE, Murase N. Carbon monoxide inhalation protects rat intestinal grafts from ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol.* 2003;163:1587-98.
28. Gores GJ, Nieminen AL, Fleishman KE, Dawson TL, Herman B, Lemasters JJ. Extracellular acidosis delays onset of cell death in ATP- depleted hepatocytes. *Am J Physiol.* 1988;255:C315-C322.
29. Buderus S, Siegmund B, Spahr R, Krutzfeldt A, Piper HM. Resistance of endothelial cells to anoxia-reoxygenation in isolated guinea pig hearts. *Am J Physiol.* 1989; 257:H488-93.
30. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest.* 1982;47:412-26.
31. Chan KL, Chan CW, Tam PKH. Segmental small bowel allograft ischemic injury and regeneration. *J Pediatr Surg.* 1998;33:1703-6.
32. Pascher A, Klupp J. Biologics in the treatment of transplant rejection and ischemia/reperfusion injury. *Biodrugs.* 2005;19:211-31.
33. Furchgott R.F., Zawadzki J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 1980;288:373-6.
34. Farivar AS, Krishnadasan B, Naidu BV, et al.: Endogenous interleukin-4 and interleukin-10 regulate experimental lung ischemia reperfusion injury. *Ann Thorac Surg.* 2003;76:253-9.
35. Pasare C, Medzhitov R. Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science.* 2003;299:1033-6.
36. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature.* 2006;441:235-8.
37. Danese S, Gao B. Interleukin-6: a therapeutic Jekyll and Hyde in gastrointestinal and hepatic diseases. *Gut.* 2010;59:149-51.
38. Xing Z, Gauldie J, Cox G, Baumann H, Jordana M, Lei XF, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest.* 1998;101:311-20.
39. Vermeire S, Van Assche G, Rutgeerts P. C-reactive protein as a marker for inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2004;10:661-5.
40. Ertel W, Faist E, Nestle C, Hueltner L, Storck M, Schildberg FW. Kinetics of interleukin-2 and interleukin-6 synthesis following major mechanical trauma. *J Surg Res.* 1990;48:622-8.

41. Guo W, Dickerson C, Chrest FJ, et al: Increased levels of circulating interleukin 6 in burn patients. *Clin Immunol Immunopathol*. 1990; 54:361-71.
42. Riedemann NC, Neff TA, Guo RF, et al: Protective effects of IL-6 blockade in sepsis are linked to reduced c5a receptor expression. *J Immunol*. 2003; 170:503-7.
43. Calandra T, Gerain J, Heumann D, Baumgartner JD, Glauser MP. High circulating levels of interleukin-6 in patients with septic shock: Evolution during sepsis, prognostic value, and interplay with other cytokines. The Swiss-Dutch J5 Immunoglobulin Study Group. *Am J Med*. 1991; 91:23-9.
44. Presterl E, Lassnigg A, Mueller-Uri P, El-Menyawi I, Graninger W. Cytokine profile and correlation to the APACHE III and MPM II scores in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;156:825-32.
45. Goepfert AR, Andrews WW, Waldemar C, Ramsey PS, Cliver SP, Goldenberg RL, Hauth JC. Umbilical cord plasma interleukin-6 concentrations in preterm infants and risk of neonatal morbidity. *Am J Obstet Gynecol*. 2004;191:1375-81.
46. Romagnoli C, Frezza S, Cingolani A, DeLuca A, Puopolo M, DeCarolis MP, Vento G, Antinori A, Tortorolo G: Plasma levels of interleukin-6 and interleukin-10 in preterm neonates evaluated for sepsis. *Eur J Pediatr*. 2001;160:345-50.
47. Jansen PM, van der Pouw Kraan TCTM, de Jong IW, et al: Release of interleukin-12 in experimental Escherichia coli septic shock in baboons: Relation to plasma levels of interleukin-10 and interferon-g. *Blood*. 1996; 87:5144-51.
48. Van Zee KJ, DeForge LE, Fischer E, et al: IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration. *J Immunol* 1991; 146:3478-82.
49. Oltean M, Zhu C, Mera S, Pullerits R, Mattsby-Baltzer I, Mölne J, Hallberg E, Blomgren K, Olausson M. Reduced liver injury and cytokine release after transplantation of preconditioned intestines. *J Surg Res*. 2009;154:30-7.
50. Kimizuka K, Nakao A, Nalesnik MA, Demetris AJ, Uchiyama T, Ruppert K, Fink MP, Stolz DB and Murase N. Exogenous IL-6 Inhibits Acute Inflammatory Responses and Prevents Ischemia/Reperfusion Injury after Intestinal Transplantation. *Am J Transpl*. 2004;4:482-94.
51. Sanchez RN, Chan CK, Garg S, Kwong JM, Wong MJ, Sadun AA, Lam TT Interleukin-6 in retinal ischemia reperfusion injury in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:4006-11.
52. Krizanac-Bengez L, Kapural M, Parkinson F, Cucullo L, Hossain M, Mayberg MR, Janigro D. Effects of transient loss of shear stress on blood-brain barrier endothelium: role of nitric oxide and IL-6. *Brain Res*. 2003; 977:239-46.

53. Rubany GM, Polokoff MA. Endothelins: Molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol Rev.* 1994;46:325-415.
54. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988;332:411-5.
55. Chow M., Dumont AS, Kassell NF. Endothelin receptor antagonists and cerebral vasospasm: an update. *Neurosurgery.* 2002; 51:1333-42.
56. Masaki T, Rossi GP, Lüscher TF, Pessina AC. The endothelin family: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000;35[Suppl2]:S3-S5.
57. Wyllie AH, Morris RG, Smith AL, Dunlop D: Chromatin cleavage in apoptosis: association with condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J Pathol.* 1984;142:67-77.
58. McConkey DJ, Hartzell P, Nicotera P, Orrenius S: Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thymocytes. *FASEB J.* 1989;3:1843-9.
59. Power C, Fanning N, Redmond HP. Cellular apoptosis and organ injury in sepsis: a review. *Shock.* 2002;18:197-211.
60. Thaete LG, Neerhof MG, Silver RK. Differential effects of endothelin A and B receptor antagonism on fetal growth in normal and nitric oxide-deficient rats. *J Soc Gynecol Invest.* 2001;8:18-23.
61. Neerhof MG, Silver RK, Caplan MS. Endothelin receptor A antagonism prevents hypoxia-induced intrauterine growth restriction in the rat. *Am J Obstet Gynecol.* 1997;176:73-6.
62. Ogata M, Iwamoto T, Tazawa N, Nishikawa M, Yamashita J, Takaoka M, et al. A novel and selective Na⁺/Ca²⁺ exchange inhibitor, SEA 0400, improves ischemia/reperfusion-induced renal injury. *Eur J Pharmacol.* 2003;478:187-98.
63. Stammberger U, Carboni GL, Hillinger S, Schneiter D, Weder W, Schmid RA. Combined treatment with endothelin- and PAF-antagonists reduces posttransplant lung ischemia/reperfusion injury. *J Heart Lung Transplant.* 1999;18:862-8.
64. Shennib H, Serrick C, Saleh D, Reis A, Stewart DJ, Giaid A. Plasma endothelin-1 levels in human lung transplant recipients. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;26(Suppl 3):S516-8.
65. Lopez-Farre A, Riesco A, Espinosa G, et al. Effect of endothelin-1 on neutrophil adhesion to endothelial cells and perfused heart. *Circulation.* 1993;88:1166-71.

66. Ishida K, Takeshige K, Minakami S. Endothelin-1 enhances superoxide generation of human neutrophils stimulated by the chemotactic peptide N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine. *Biochem Biophys Res Commun* . 1990;173:496-500.
67. Sunose Y, Ohwada S, Takeyoshi I, Matsumoto K, Tsutsumi H, Tomizawa N, Kawate S, Morishita Y. Effects of endothelin receptor antagonist TAK-044 on small bowel autograft from a controlled non-heart-beating donor model. *Surgery*. 2001;130:819-25.
68. Wolfárd A, Vangel R, Szalay L, Kaszaki J, Haulik L, Balogh A, Nagy S, Boros M. Endothelin-A receptor antagonism improves small bowel graft perfusion and structure after ischemia and reperfusion. *Transplantation*. 1999;68:1231-8.
69. Hiroyasu S, Shiraishi M, Kusano T, Muto Y. Involvement of endothelin in graft-versus-host disease after rat small bowel transplantation. *Transpl Int*. 1997;12:1-4.
70. Umansky SR, Cuenco GM, Khutzian SS, Barr PJ, Tomei LD. Post-ischemic apoptotic death of rat neonatal cardiomyocytes. *Cell Death Differ*. 1995;2:235-41.
71. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest*. 1994;94:1621-8.
72. Piot CA, Wolfe CL. Apoptosis: a new mechanism of lethal myocardial "reperfusion injury"? *J Thromb Thrombol*. 1997;4:67.
73. Deveraux QL, Reed JC. IAP family proteins-suppressors of apoptosis. *Genes Dev*. 1999;13:239.
74. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. *Animais de laboratório: Ética e Legislação*. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/etica.htm>.
75. Smallwood JE. *A guided tour of veterinary anatomy. Domestic ungulates and laboratory mammals*. New York: WB Saunders; 1992. Vol. 2. P. 52-63.
76. Sisson and Grossman's. *The Anatomy of the domestic animals*. New York: WB Saunders; 1975. Vol. 2. P.1189-202.
77. Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig Dis Sci*. 2004;49:1359-77.
78. Tolosa EM, Goffi FS, Behmer OA, Fujimura I, Lemos PC, Freitas-Neto AG, Nakashima Y. Homologous transplantation of the small intestine in dogs. Histological evaluation of rejection. *AMB Rev Assoc Med Bras*. 1971;17:303-6.
79. Galvão FH, Waitzberg DL, Lee ADW, Tolosa EMC. Transplante ortotópico de intestino delgado em ratos Wistar. Técnica microcirúrgica e análise da rejeição aguda. In: *Anais Congresso Brasileiro de Cirurgia*, Rio de Janeiro; 1993.

80. Galvão FH, Waitzberg DL, Logulo AF, Sementilli A, Rompenso SC, Lima-Gonçalves E. Alterações histopatológicas do intestino delgado após preservação hipotérmica com as soluções da Universidade de Wisconsin e Euro-Collins. Estudo experimental. *AMB: Rev Assoc Med Bras*. 1995;41:187-92.
81. Santos MM, Tannuri U, Tannuri ACA, Coelho MCM. Description of a new model of intestinal denervation and in situ ischemia-reperfusion injury using the cecal artery for perfusion. *Transpl Proc*. 2009;41:3617-21.
82. da Silva RF, de Paula AC, Arroyo PC Jr, Gonzales AM, Marchini JS, Duca WJ, de Faria WL, Rocha MF, de Felício HC, Abbud-Filho M, da Silva RC. Report of initial experience in small bowel transplantation at São José do Rio Preto Medical School Hospital. *Transpl Proc*. 2008;40:827-9.
83. Congresso Brasileiro de Transplante de Órgãos; 2001; Vitória, ES. 7. *Anais*. Vitória; 2001.
84. Kaufman SS, Atkinson JB, Bianchi A, Goulet OJ, Grant D, Langnas AN, McDiarmid SV, Mittal N, Reyes J, Tzakis AG; American Society of Transplantation. Indications for pediatric intestinal transplantation: a position paper of the American Society of Transplantation. *Pediatr Transplant*. 2001;5:80-7.
85. Magee JC, Krishnan SM, Benfield MR, Hsu DT, Shneider BL. Pediatric transplantation in the United States, 1997-2006. *Am J Transplant*. 2008;8:935-45
86. Rudolph J A, Squires R. Current concepts in the medical management of pediatric intestinal failure. *Curr Opin Organ Transpl*. 2010, 15:324-9.
87. Pironi L, Hébuterne X, Van Gossum A, Messing B, Lyszkowska M, Colomb V, Forbes A, Micklewright A, Villares JM, Thul P, Bozzetti F, Goulet O, Staun M. Candidates for intestinal transplantation: a multicenter survey in Europe. *Am J Gastroenterol*. 2006;101:1633-43.
88. Tannuri U, Mathias AL, Brito, IA. Prolonged parenteral nutrition in pediatric surgery. Experience in 55 cases. *AMB Rev Assoc Med Bras*. 1979;25:143-5.
89. Maksoud JG, Tanuri U, Amaral IA. Prolonged parenteral nutrition in pediatric surgery: nitrogen balance, comparison of 2 types of aminoacid solutions. *Ver Hosp Clin Fac Med São Paulo*. 1977;32:353-8.
90. Russell WMS, Burch RL. The principles of humane experimental technique. Hyperion Books; 1992. 238p.
91. Nemzek JA, Xiao H, Minard AE, Bolgos GL, Remick DG. Humane endpoints in shock research. *Shock*. 2004;21:17-25.

92. Manciocco A, Chiarotti F, Vitale A, Calamandrei G, Laviola G, Alleva E. The application of Russell and Burch 3R principle in rodent models of neurodegenerative disease: The case of Parkinson's disease. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009;33:18-32.
93. Yandza T, Gerhardt MF, Saint-Paul MC, Braud V, Gugenheim J, Hebuterne X. Significance of serum bile acids in small bowel allograft rejection in pigs transplantation. *Transplantation.* 2009;87:24-8.
94. Akcakaya A, Alimoglu O, Sahin M, Abbasoglu SD. Ischemia – reperfusion injury following superior mesenteric artery occlusion and strangulation obstruction. *J Surg Res.* 2002;108:39-43.
95. Nayyar N, Mazariegos G, Ranganathan S, Soltys K, Bond G, Jaffe R, Sun Q, Nucci A, Kosmach B, Squires R, Abu-Elmagd K, Sindhi R. Pediatric small bowel transplantation. *Sem Pediatr Surg.* 2010;19:68-77.
96. Ghosh S, Roberts N, Firmin RK, Jameson J, Spyt TJ. Risk factors for intestinal ischaemia in cardiac surgical patients. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002;21:411-6.
97. Reber PU, Peter M, Patel AG, Stauffer E, Printzen G, Mettler D. Ischaemia/reperfusion contributes to colonic injury following experimental aortic surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2001;21:35-9.
98. Banga NR, Homer-Vanniasinkam S, Graham A, Al-Mukhtar A, White SA, Prasad KR.. Ischaemic preconditioning in transplantation and major resection of the liver. *Br J Surg.* 2005; 92:528-8.
99. Prasad A, Stone, G W, Holmes, DR, Gersh B. Reperfusion injury, microvascular dysfunction and cardioprotection: The "dark side" of reperfusion. *Circulation.* 2009;120:2105-12.
100. Matsumoto CS, Kaufman SS, Girlanda R, Little CM, Rekhman Y, Raofi VLaurinJM, Shetty K, Fennelly EM, Johnson LB, Fishbein TM. Utilization of donors who have suffered cardiopulmonary arrest and resuscitation in intestinal transplantation. *Transplantation.* 2008;86:941-6.
101. Murayama T, Tanabe M, Matsuda S, Shimazu M, Kamei S, Wakabayashi G, Kawachi S, Matsumoto K, Yamazaki K, Matsumoto K, Koyasu S, Kitajima M. JNK (c-Jun NH2 Terminal Kinase) and p38 during ischemia reperfusion injury in the small intestine. *Transplantation.* 2006;81:1325-30.
102. Shimizu Y, Newman W, Tanaka Y, Shaw S. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today.* 1992;13:106.

103. Farmer DG, Shen XD, Amersi F, Anselmo D, Ma JP, Ke B, Gao F, Dry S, Fernandez S, Shaw GD, McDiarmid SV, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski J. CD62 blockade with P-Selectin glycoprotein ligand-immunoglobulin fusion protein reduces ischemia-reperfusion injury after rat intestinal transplantation. *Transplantation*. 2005;79:44-51.
104. Pirenne J, Benedetti E, Gruessner A, Moon C, Hakim N, Fryer JP, et al. Combined transplantation of small and large bowel: FK506 versus cyclosporine A in a porcine model. *Transplantation*. 1996;61:1685-94
105. Yamada T, Murase N, Maeda T, Ye Q, Sakamoto T, Terakura M, Starzl TE, Todo S. Protective effect of TNF-alpha and IL-1 beta inhibitor FR167653 on ischemia-reperfusion injury in rat small intestinal transplantation. *Transplant Proc*. 1998;30:2638.
106. Wei Z, Fan L, Xiangming C. Essential role for nuclear factor kappaB in ischemic preconditioning for cold ischemia-reperfusion injury of intestinal transplantation. *Transplant Proc*. 2009;41:4120-2.
107. Liu K-X, Chen S-Q, Huang W-O, Li, Y-S, Irwin MG, Xia Z. Propofol pretreatment reduces ceramide production and attenuates intestinal mucosal apoptosis induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Anesth Analg*. 2008;107:1884-91.
108. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74: 1124-36.
109. Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA, Graf R, Kadry Z, Rousson V. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg*. 2003; 238: 843-50.
110. Puisieux F, Deplanque D, Pu Q, Souil E, Bastide M, Bordet R. Differential role of nitric oxide pathway and heat shock protein in preconditioning and lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance. *Eur J Pharmacol*. 2000;389:71-8.
111. Papanastasiou S, Estdale SE, Homer-Vanniasinkam S, Mathie RT. Protective effect of preconditioning and adenosine pretreatment in experimental skeletal muscle reperfusion injury. *Br J Surg*. 1999;86:916-22.
112. Sakurai M, Hayashi T, Abe K, Aoki M, Sadahiro M, Tabayashi K. Enhancement of heat shock protein expression after transient ischemia in the preconditioned spinal cord of rabbits. *J Vasc Surg*. 1998;27:720-5.
113. Li Y, Roth S, Laser M, Ma JX, Crosson CE. Retinal preconditioning and the induction of heat-shock protein 27. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44:1299-304.

-
114. Jefayri MK, Grace PA, Mathie RT. Attenuation of reperfusion injury by renal ischaemic preconditioning: the role of nitric oxide. *BJU Int.* 2000;85: 1007-13.
 115. Hotter G, Closa D, Prados M, Fernandez-Cruz L, Prats N, Gelpi E et al. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;222:27-32.
 116. Wu B, Iwakiri R, Tsunada S, Utsumi H, Kojima M, Fujise T. iNOS enhances rat intestinal apoptosis after ischemia – reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:649-58.
 117. Davis JM, Gute DC, Jones S, Krsmanovic A, Korthuis RJ. Ischemic preconditioning prevents postischemic P-selectin expression in the rat small intestine. *Am J Physiol.* 1999;277:H2476-81.