OSCAR HARUO HIGA

**Determinantes morfológicos do efeito do ácido
ascórbico na isquemia/reperfusão experimental
do intestino delgado**

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

Área de concentração: Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Vera Luiza Capelozzi

São Paulo
2005

FICHA CATALOGRÁFICA

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

©reprodução autorizada pelo autor

Higa, Oscar Haruo

**Determinantes morfológicos do efeito do ácido ascórbico na isquemia/
reperusão experimental do intestino delgado** / Oscar Haruo Higa. -- São
Paulo, 2005.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Patologia.

Área de concentração: Patologia .

Orientadora: Vera Luiza Capelozzi.

Descritores: 1.ÁCIDO ASCÓRBICO 2.ISQUEMIA/cirurgia 3.REPERFUSÃO
4.INTESTINO DELGADO 5.TÉCNICAS HISTOLÓGICAS 6.RATOS WISTAR

USP/FM/SBD-225/05

DEDICATÓRIA

À minha esposa, Rita de Cássia, a quem devo o entusiasmo que foi decisivo neste projeto. A ela, pela dedicação, determinação e tenacidade; o meu amor.

À Keila, Karine e Kátia, filhas amadas que, superando minha ausência, sempre me incentivaram; por elas e para elas, concluí mais esta etapa.

Ao meu irmão, Dr. Cláudio Higa, que me mostrou o caminho exemplar do exercício da Medicina e da arte do ensino médico.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar e acima de tudo minha gratidão à professora Dra. Vera Luiza Capelozzi pelo seu entusiasmo, empenho pessoal, companheirismo e presença imprescindível em todas as etapas deste trabalho. Minha admiração e gratidão transcendem o reconhecimento da grande e respeitada profissional. Exalto a figura humana, amiga e solidária que dedica sua vida à ciência e ao ensino daqueles que no seu exemplo buscam o caminho da pesquisa.

Meus agradecimentos às pessoas que contribuíram diretamente e de muitas maneiras para a realização deste trabalho.

Aos Prof. Dr. Paulo Hilário Nascimento Saldiva e Prof. Dr. Raymundo Soares de Azevedo Neto pelo apoio e incentivo em todas as fases da execução deste projeto.

Aos Prof. Dr. Carlos Augusto Gonçalves Pasqualucci, Prof. Dr. Kiyoshi Iriya e Prof. Dr. Arnaldo Lichteinstein pela participação na banca de qualificação. Suas arguições, correções e sugestões foram de inestimável contribuição para a confecção deste trabalho.

À Ana Júlia de Coimbra Lichtenfels por sua presença e colaboração imprescindíveis na orientação do preparo e análise histológica.

À pesquisadora Cecília Farhat pelo indispensável auxílio e orientação na análise estatística.

Aos componentes da equipe técnica do Departamento de Patologia da Universidade de São Paulo pela sua excelência e auxílio que propiciaram a realização deste estudo.

Ao Dr. Armelin Utino, amigo e companheiro, exímio cirurgião; sua presença profissional no transcorrer destes anos foi fundamental para a aquisição do meu legado técnico.

Ao Prof. Dr. Nader Wafae por ter-me introduzido à pesquisa científica e me apoiado até o final desta jornada.

Ao Prof. Dr. Paulo de Oliveira Gomes pelo seu exemplo profissional, amizade e incentivo.

Ao Prof. Dr. Murched Omar Taha por ter contribuído de maneira fundamental para aquisição de conhecimentos indispensáveis à cirurgia experimental.

À Liduvina da Silva Neto de Barros sempre prestativa, amiga e exemplar profissional que nunca mediu esforços para me ajudar nestes anos.

Aos Dr. Dino de Aguiar Cintra e Dr. Glauco de Aguiar Cintra pela amizade, entusiasmo e cessão de instrumental de micro cirurgia.

Ao Ronaldo de Abreu pelo seu interesse e companheirismo que muito me auxiliou na dosagem e preparo das substâncias utilizadas no experimento

Ao Dr. Vanderlei Gimenez pelo apoio, colocando toda a estrutura do Laboratório de Técnica Cirúrgica da UNOESTE para a execução deste experimento.

Ao Jair Alves Ferreira, auxiliar de docência da UNOESTE, meu especial agradecimento pela sua indispensável atuação no laboratório e pelo zelo dispensado aos animais.

Aos Dr. Antonio Plácido Pereira e Dr. Antonio Luiz de Arruda Matos pela elaboração, preparação e fotografia das peças histológicas durante o desenvolvimento do projeto piloto.

À Profa. Ana Cardoso Maia de Oliveira Lima idealizadora da Universidade do Oeste Paulista, pelo seu apoio para a qualificação e aprimoramento de seu corpo docente, que disponibilizou recursos técnicos e materiais para realização deste estudo.

A Diretoria Clínica e Administrativa da Santa Casa de Presidente Prudente pelos anos de convívio e por oportunizar o meu desenvolvimento profissional.

A Sociedade de Medicina de Presidente Prudente, órgão representativo das atividades da classe médica, pelo conagraamento e intercâmbio científico, fundamentais para o exercício profissional.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq – órgão financiador deste projeto, fato que muito contribuiu para a viabilização desta tese.

À Magnífica Universidade de São Paulo, marco do saber e esperança para a nação, sua existência e legado são o orgulho do Brasil.

Esta tese está de acordo com:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

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

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Patologias relacionadas à isquemia/reperfusão	2
1.2	Transplante intestinal: uma solução proposta	3
1.3	Fisiopatologia do processo isquemia/reperfusão	4
1.3.1	Isquemia	4
1.3.2	Reperfusão	5
1.4	Radicais livres	8
1.5	Implicações da organização histoanatômica do intestino delgado ..	11
1.5.1	Histologia do intestino delgado	11
1.5.2	Anatomia da irrigação do intestino.....	14
1.5.3	Anatomia vascular do jejuno de rato.....	14
1.6	Implicações dos mecanismos de agressão e defesa intestinais	15
1.6.1	Mecanismos de agressão	15
1.6.2	Mecanismos de defesa intestinais	16
1.7	Utilização de antioxidantes.....	20
1.8	Utilização do ácido ascórbico	21
1.9	Métodos de avaliações de lesões	23
1.10	Justificativa do estudo	24
2	OBJETIVOS	27
2.1	Geral	28
2.2	Específicos	28
3	MÉTODOS	29
3.1	Amostra	30
3.2	Delineamento experimental.....	30
3.3	Etapas experimentais	31
3.3.1	Procedimento operatório	32

3.4	Morfologia	34
3.4.1	Análise histológica	34
3.4.2	Análise morfométrica	35
3.5	Análise estatística	36
4	RESULTADOS	38
4.1	Macroscopia	39
4.2	Histologia	40
4.3	Análise morfométrica.....	44
5	DISCUSSÃO	50
5.1	O período de reperfusão aumenta a lesão intestinal.....	51
5.2	Influência do tempo na lesão intestinal de isquemia/reperfusão	52
5.3	Fatores implicados na alteração de lesão do intestino.....	53
5.4	Outros métodos de avaliações de lesões.....	54
5.5	Avaliação quantitativa morfométrica.....	55
5.6	Outras terapêuticas experimentais testadas	56
5.7	Outros antioxidantes utilizados	59
5.8	Lesões intestinais de isquemia/reperfusão na margem contra- mesentérica.....	61
5.9	Benefício do ácido ascórbico também na isquemia	62
5.10	Possibilidades de utilização de ácido ascórbico.....	64
6	CONCLUSÕES.....	66
	Geral	67
	Específicas	67
7	REFERÊNCIAS	68

Apêndices

RESUMO

Higa OH. *Determinantes morfológicos do efeito do ácido ascórbico na isquemia/reperfusão experimental do intestino delgado* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2005. 76p.

A isquemia/reperfusão intestinal está presente em numerosos quadros clínicos como: isquemia mesentérica, obstrução intestinal, hérnia encarcerada, volvo intestinal e enterocolite necrosante. Como conseqüências destas lesões os pacientes podem desenvolver diarreia, mal absorção, síndrome do intestino curto e até morte. Lesões de isquemia/reperfusão são de importância fundamental em procedimentos cirúrgicos. Estas lesões compreendem uma série complexa de seqüência na quais alguns radicais livres gerados durante este período estão envolvidos. Devido à ação dos radicais livres de oxigênio na lesão de isquemia/reperfusão, grupos de antioxidantes têm sido testados com potencialidade de uso para os marcadores morfológicos de lesão intestinal. Dentre estes o ácido ascórbico tem se mostrado promissor. Esta vitamina que apresenta propriedades de redução, quelação e varredores de radicais livres produzidos durante a isquemia/reperfusão. Este estudo foi feito para determinar o potencial do ácido ascórbico em atenuar a lesão de isquemia/reperfusão no intestino de rato. Cinquenta ratos *Wistars* foram separados em cinco grupos, cada qual contendo 10 ratos; grupo I, submetido à isquemia mesentérica por 40 minutos; grupo I/R, período de isquemia mais reperfusão por 30 minutos; grupo IA, isquemia mais ácido ascórbico; grupo IRA, isquemia/reperfusão mais ácido ascórbico; grupo S(sham), animais submetidos à anestesia e laparotomia, mas sem isquemia/reperfusão intestinal. Os grupos controles isquemia e isquemia/reperfusão receberam administração intra peritonal de solução salina fisiológica e os grupos experimentos receberam ácido ascórbico. A análise histológica morfométrica do jejuno foi realizada na margem mesentérica e anti-mesenterica do intestino. Foi utilizado um retículo integrado com um sistema coerente constituído de 100 pontos e 50 linhas de medidas conhecidas acoplada à ótica do microscópio. O exame de cada corte foi realizado com amostras de aumento de 100X até 400X, a fração de área das vilosidades, criptas, necroses, infartos hemorrágicos e células inflamatórias foram determinados pela técnica de contagem dos pontos-linhas. O grupo isquemia/reperfusão ácido ascórbico apresentou redução significativa do infarto hemorrágico das vilosidades na margem anti-mesentéricas ($p=0,009$) O grupo isquemia ácido ascórbico apresentou redução da necrose das vilosidades ao longo de ambas as margens. As frações de área das vilosidades, criptas e células inflamatórias nos grupos experimentos não mostraram diferenças significantes. As lesões foram mais intensas na margem anti-mesentérica da mucosa em todos os grupos. Estes resultados indicam para a utilidade da análise histológica morfométrica como método quantitativo O ácido ascórbico foi efetivo na redução de alguns indicativos de danos intestinais causados pela isquemia/reperfusão em ratos.

Descritores: 1. ÁCIDO ASCÓRBICO 2. ISQUEMIA/cirurgia 3. REPERFUSÃO 4. INTESTINO DELGADO 5. HISTOLOGIA TECNICAS 6. RATOS WISTAR

SUMMARY

Higa OH. *Morphological determinants of ascorbic acid effect in an experimental small bowel ischemia/reperfusion* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2005. 76p.

The clinical situation in which intestinal ischemia is involved are numerous and include acute mesenteric ischemia, intestinal obstruction, incarcerated hernia, gut volvulus and necrotizing enterocolitis. The consequences of mesenteric ischemia are devastating to the patient and usually result in diarrhea, malabsorption, short gut syndrome and even death. Injury resulting from ischemia/reperfusion is of fundamental importance in surgical procedures. The injury of ischemia/reperfusion comprises a series of complex sequential; some oxygen-derived free radicals generated during this time possibly play an important role. Because of oxygen radical are involved in ischemia/reperfusion injury, a group of anti-oxidants has been target as potential useful morphological markers of small intestine injury. Among these, ascorbic acid has shown promised. This vitamin has reducing and chelating properties and washing out radicals after oxidation by free radicals produced during ischemia/reperfusion. This study was to determine the potential of ascorbic acid to attenuate ischemia/reperfusion injury in the rat intestine. Fifty male *Wistars* rats were divided into five groups, each containing 10 rats; group I, were submitted to mesenteric ischemia for 40 minutes; group I/R, ischemia plus reperfusion for 30 minutes; group IA, ischemia plus acid ascorbic; group IRA, ischemia-reperfusion plus acid ascorbic; group S(sham), animals had anesthesia and laparotomy but not induced intestinal ischemia/reperfusion. The controls groups ischemia and ischemia/reperfusion were intraperitoneally administered saline solution and the experimental groups were pretreated with ascorbic acid. The jejunum histological morphometric analysis was performed at mesenteric and antimesenteric margin of the gut. It was used an integrating eyepiece with a coherent system made of a 100-point grid, consisting of 50 lines of known length coupled to a light microscope. The exam of the section were a cascade progressive sampling approach at x100 to x 400 magnification, and the fractional areas of villous length, crypts, necrosis, hemorrhagic infarct and inflammatory cells were determined by the point-counting technique. The animals that received ascorbic acid showed a significant reduction of antimesenteric villous infarct ($p=0,009$) in the ischemia/reperfusion group and reduction of villous necrosis along the both margins in the ischemia groups. The fractional areas of villous length, crypts, and inflammatory cells in the experimental groups did not show significant differences compared with controls groups. The major lesions in all groups were along the antimesenteric mucosal margin. These results indicate that histological morphometric analysis is a useful quantitative method. The ascorbic acid was effective in reducing some intestinal damage indicators caused by ischemia/reperfusion in the rats.

Describers: 1. ASCORBIC ACID 2. ISCHEMIA/surgery 3. REPERFUSION 4. SMALL INTESTINE 5. HISTOLOGICAL TECHNIQUES 6. WISTAR RATS

1 INTRODUÇÃO

1.1 Patologias relacionadas à isquemia/reperfusão

A lesão originada do processo de isquemia/reperfusão está presente na patogenia de várias doenças clínicas e cirúrgicas de diversos órgãos dentre as quais, o intestino delgado (Thomson et al., 2001). A isquemia/reperfusão intestinal induz a falha da barreira mucosa intestinal com translocação de bactérias entéricas para a circulação sistêmica atingindo sítios extra-intestinais (Redan et al., 1990). Isto conduz para o aumento dos mediadores inflamatórios, adesão dos leucócitos, ativação das enzimas pancreáticas, disfunção endotelial e íleo paralítico (Zhi-Young et al., 1992).

O intestino atua como órgão terminal da lesão de isquemia/reperfusão de outros órgãos. A reperfusão de membros inferiores previamente isquêmicos em ratos está associada com ativação de citocinas e aumento significativo de concentração plasmática de endotoxinas. Yassin et al. (1996) verificaram que estas endotoxinas causam alterações na permeabilidade intestinal, isto pode ser um dos fatores importantes na progressão da síndrome de falência de múltiplos órgãos pela amplificação da resposta inflamatória ao trauma. A isquemia/reperfusão mesentérica induzida pelo choque tem sido considerada a regra primordial dos danos das estruturas envolvidas na falência de múltiplos órgãos.

As evidências indicam que mediadores inflamatórios como as citocinas liberadas durante a isquemia/reperfusão intestinal aumentam a permeabilidade nos pulmões. O isolamento do intestino durante o período de isquemia e reperfusão com a redução da absorção local das citocinas pode evitar as lesões pulmonares (Narita et al., 2004).

As patologias cirúrgicas do intestino que envolve lesões de isquemia/reperfusão são: trombose ou embolia mesentérica, obstrução intestinal, hérnia encarcerada, volvo intestinal, extensas aderências, traumas de região mesentérica, enterite actínica, doença de Crohn, enterite necrosante (Minocha et al., 1999). Os danos intestinais provocados nessas situações podem causar graves complicações, como: diarréia crônica, síndrome de mal-absorção, síndrome do intestino curto e alto índice de mortalidade, apesar dos progressos nos métodos diagnósticos e melhoria dos suportes de pré e pós-operatório (Mustafá et al., 1993).

1.2 Transplante intestinal: uma solução proposta

O transplante intestinal pode ser a solução para pacientes submetidos a ressecções intestinais extensas e com síndrome de intestino curto. O sucesso do transplante do intestino delgado depende de vários fatores, como: ocorrência de rejeição, reação do enxerto, infecção e incapacidade de implementação da alimentação enteral no pós-operatório (Katz et al., 1995). Além destes fatores, a lesão de

isquemia/reperfusão intestinal é um importante evento a ser controlado para um bom resultado do transplante.

A lesão de isquemia/reperfusão está envolvida em várias patologias do intestino e em diversas etapas do transplante. Para que se obtenha a diminuição das lesões e complicações, é necessário o conhecimento da fisiopatologia a fim de que sejam utilizados novos métodos e substâncias nas diversas fases de agressão e defesa.

1.3 Fisiopatologia do processo isquemia/reperfusão

A lesão de isquemia/reperfusão é complexa e um processo ainda não totalmente compreendido. Este é um processo antígeno independente que é mediado por vários mecanismos (Laskowiskr et al., 2000).

1.3.1 Isquemia

Segundo Kumar et al. (2005), o tecido submetido à isquemia apresenta uma diminuição da tensão de oxigênio na célula, ocorrendo uma perda da fosforização oxidativa e redução na geração de ATP. A diminuição da quantidade de ATP resulta em falha da bomba de sódio e água, causando consequentemente, edema celular. Ocorre uma queda progressiva de glicogênio e redução de síntese protéica. Pode haver sérias

consequências funcionais neste estágio. Se a hipóxia continuar, o agravamento da redução de ATP causa maior deterioração morfológica. O cito esqueleto se dispersa, resultando na perda das características ultra-estruturais.

1.3.2 Reperusão

Entre os possíveis mecanismos causadores do desenvolvimento e progressão da lesão de reperusão estão inclusas a adesão de neutrófilos polimorfonucleares, a liberação de citocinas pró-inflamatórias e as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Existem evidências de que neutrófilos polimorfonucleares sejam os principais mediadores da lesão de isquemia/reperusão (Moore et al., 1994). Os neutrófilos também representam a maior fonte de geração de radicais livres oriundos da mucosa intestinal que sofrem o processo de agressão por isquemia/reperusão. Grisham (1994) e Farmer et al. (2005) demonstraram a participação de neutrófilos no mecanismo da lesão com a utilização de glicoproteínas P-selectin. Esta substância adere às plaquetas e polimorfonucleares prevenindo a infiltração de leucócitos, determinando uma interrupção da cascata de lesão tecidual e bloqueio do processo inflamatório.

Durante o processo, citocinas antiinflamatórias são produzidas. A interleucina 10 é uma potente citocina antiinflamatória; ela inibe a síntese da principal citocina pró inflamatória, atuando como moduladora e

reguladora da resposta imune humoral, atenuando as reações imunes mediadas pelas células. As citocinas podem participar de importantes reações do infarto mesentérico (Zigarelli et al., 2001).

Cuzzocrea et al. (2004) utilizando lipoproteínas de alta densidade (HDLs) verificaram o efeito benéfico do HDL na prevenção de formação de malondialdeído (MDA) e redução de liberação de fator de necrose tumoral (TNF alfa) e interleucina 1 (IL 1 beta). O HDL é uma substância que atua inibindo a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade, ou modulando a vasodilatação e ativação das plaquetas que são mediadas por alterações na produção de prostaciclina.

O fator ativador das plaquetas (PAF) parece exercer um importante papel na isquemia/reperfusão associado com disfunção intestinal e desenvolvimento de alterações em órgãos distantes, provavelmente pelo desencadeamento do desarranjo endotelial e da barreira epitelial. O fator ativador das plaquetas é um dos mais potentes mediadores lipídicos endógenos da inflamação, liberada por várias células endoteliais, plaquetas e leucócitos ativados (Mustafá et al., 2003). Além disso, o PAF parece estar particularmente envolvido na ativação do sistema protease-antiprotease. Estas evidências foram estudadas por Sun et al. (2000) que verificaram o efeito benéfico da utilização de lexipafan, um antagonista do fator ativador das plaquetas na disfunção da barreira intestinal causada por isquemia e reperfusão em ratos.

A bradicinina atua no processo inflamatório agudo pelo aumento da permeabilidade microvascular, vasodilatação, migração e

agregação de leucócitos e a produção de ácido araquidônico, via ativação da fosfolipase A2. Metabólitos do ácido araquidônico ou eicosanóides são potentes moduladores da função biológica, particularmente da inflamação. A Bradicinina exerce seu efeito inflamatório via receptora B2 da bradicinina. Arakawa et al. (2005) em seu estudo comprovam a ação da bradicinina, com a melhora da lesão de isquemia/reperfusão do intestino delgado de cão utilizando FR173657, um antagonista do receptor B2 da bradicinina.

Figura 1. Esquema demonstrativo de lesão de isquemia/reperfusão (Collard, 2001).

1.4 Radicais livres

Estudos recentes têm demonstrado que radicais livres de oxigênio estão envolvidos em diversos fenômenos biológicos, incluindo danos de radiação, carcinogênese, diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas e também na lesão de isquemia/reperfusão do intestino delgado (Southard et al., 1991).

Segundo McCord (1985), radical livre é uma espécie química com capacidade de existência independente, com um número ímpar de elétrons, contendo uma ligação ou uma meia ligação aberta, caracterizando com isto, sua reatividade química. As espécies reativas de oxigênio (ROS) são radicais livres associados ao átomo de oxigênio ou a seu equivalente. Os ROS possuem uma maior reatividade com diferentes moléculas que se comparadas com as de oxigênio. Usualmente os ROS são representados por quatro espécies: anion superóxido (O^{2-}), peróxido de hidrogênio (H^2O^2), radical hidroxila ($-OH$) e oxigênio isolado (O^2), os quais constituem a maior parte dos radicais livres biologicamente importantes (Collard e Simon, 2001). O peróxido de hidrogênio e oxigênio isolado por definição não são radicais livres, embora apresentem comportamentos semelhantes.

A enzima xantina oxidase é a maior fonte de radicais superóxidos em tecidos após isquemia. Tal enzima é sintetizada sob a forma de xantina dehidrogenase. A mucosa das vilosidades do intestino delgado é o local que apresenta sua maior concentração, sendo também, provavelmente, a região mais sensível às lesões por isquemia (Shinya, 1999).

Durante a reperfusão, a elevação do substrato para xantina oxidase associado ao aumento de O_2 causam um importante acúmulo de radicais livres de oxigênio. O ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) produzido a partir da hidrogenação do ânion superóxido causam uma variedade de efeitos deletérios. Estes radicais reativos de oxigênio podem reagir com outras espécies químicas que são estrutural e funcionalmente importante para os componentes celulares, lesando-os de modo reversível ou não. Por exemplo, o Ca – ATPase da membrana celular é altamente sensível a esses radicais, que produzem lesão e perda da função da membrana antes que os outros componentes celulares sejam afetados até a morte celular (Fuh et al., 2002).

Figura 2. Mecanismo de formação de xantina oxidase durante a isquemia (McCord, 1985).

Geração de radicais livres

Figura 3. Mecanismo proposto de indução isquêmica para produção de superóxido (McCord, 1985).

Os mamíferos possuem antioxidantes próprios: superóxido dismutase (SOD) que neutralizam superóxidos, o glutatião, que neutraliza a peroxidase e a catalase, que decompõem peróxido de hidrogênio. Estas enzimas constituem o sistema responsável pela prevenção de acúmulo intracelular de níveis citotóxicos destes radicais, durante o metabolismo aeróbico normal mais importante (Gies et al., 1991). Nas patologias em que envolvem reperfusão de um tecido previamente isquêmico, ocorre um desequilíbrio da balança oxidante e antioxidante (Reilly et al., 1991; Korthuis, Granger, 1993). Nestas situações, a grande quantidade de radicais reativos de oxigênio supera a capacidade detoxicante das enzimas antioxidantes, iniciando assim a cascata de eventos que podem levar a lesão tissular.

Evidências sugerem que a falha da barreira intestinal na enterite necrozante resulta em parte da superprodução de óxido nítrico e outras espécies oxidantes tóxicas que resultam em morte celular e falha da

barreira intestinal. Kelly et al. (2004) argumentam que o sistema detoxificante do glutationa é importante para a manutenção da integridade da barreira intestinal, pela proteção contra o estresse nitrosativo. No seu trabalho, utilizando um modelo experimental de enterocolite necrosante em ratos, obtiveram resultados que dão suporte para que o sistema antioxidante glutationa (GSH) exerça um efeito crucial na barreira intestinal, pela atenuação da morte dos enterócitos.

As lesões na mucosa decorrentes da ação dos radicais livres de oxigênio caracterizam-se por massiva elevação do epitélio das vilosidades, necrose epitelial, desintegração da lâmina própria, hemorragia e ulcerações (Parks et al., 1983).

1.5 Implicações da organização histoanatômica do intestino delgado

1.5.1 Histologia do intestino delgado

O intestino delgado é o sítio terminal da digestão dos alimentos, absorção de nutrientes e secreção endócrina.

Os processos de digestão são finalizados no intestino delgado, onde os nutrientes são absorvidos pelas células epiteliais de revestimento. Três segmentos constituem o intestino delgado: duodeno, jejuno e íleo. A mucosa do intestino apresenta várias estruturas que aumentam sua

superfície, ampliando assim a área disponível para absorção de nutrientes. As dobras de mucosa e submucosa formam pregas permanentes em forma semilunar, circular ou espiral. As projeções alongadas da mucosa em direção ao lúmen formam as vilosidades intestinais ou vilos, constituídos do epitélio e lâmina própria. Entre os vilos existem pequenas aberturas de glândulas tubulares simples denominadas de glândulas intestinais, também chamadas de criptas.

O epitélio das vilosidades se continua com aqueles das glândulas. As glândulas intestinais possuem células-tronco, algumas células absortivas caliciformes de Paneth e enteroendócrinas.

A extensa superfície mucosa do trato gastrointestinal está exposta a muitos microorganismos potencialmente invasivos. Imunoglobulinas da classe IgA presente nas secreções são sintetizadas por plasmócitos e formam a primeira linha de defesa. Outro mecanismo protetor é formado pelas junções intercelulares oclusivas que fazem da camada de células epiteliais uma barreira para penetração de microorganismos. Em adição, provavelmente servindo como a principal barreira protetora, o trato gastrointestinal possui macrófagos e um número muito grande de linfócitos, localizados tanto na mucosa quanto na submucosa. Juntas, estas células forma o tecido linfóide associado ao trato digestório.

Embora os conhecimentos sobre a endocrinologia gastrointestinal ainda sejam bastante incompletos, sabe-se que a atividade do sistema digestório é claramente controlada pelo sistema nervoso e modulada por um sistema complexo de hormônios peptídicos produzidos localmente.

A lâmina própria do intestino delgado é composta por tecido conjuntivo frouxo com vasos sanguíneos e linfáticos, fibras nervosas e fibras musculares lisas. A lâmina própria preenche o centro das vilosidades intestinais, onde as células musculares lisas são responsáveis pelos movimentos rítmicos destas vilosidades, importantes para a absorção dos nutrientes.

A lâmina própria e a submucosa do intestino delgado contêm agregados de nódulos linfóides conhecidos como placas de Peyer, um importante componente do tecido linfóide associado ao trato digestório.

A camada muscular é bem desenvolvida nos intestinos, sendo esta composta de uma camada circular interna e outra longitudinal externa. A túnica serosa contém uma camada de células mesoteliais e tecido conectivo frouxo.

Os vasos sanguíneos que nutrem e removem os produtos da digestão penetram na camada muscular e formam um grande plexo na submucosa. Os capilares linfáticos do intestino surgem como capilares de fundo cego no centro das vilosidades. Estes capilares, apesar de serem maiores que os capilares sanguíneos, são de observação mais difícil porque suas paredes estão tão próximas entre si que parecem colabadas.

A inervação dos intestinos possui uns componentes intrínsecos, constituídos por grupos de neurônios que forma o plexo nervoso mioentérico (Auerbach) e o plexo submucoso (Meissner). A inervação extrínseca pertence ao sistema nervoso autônomo parassimpático e simpático (Junqueira 2004).

1.5.2 Anatomia da irrigação do intestino

O jejuno-íleo é bem vascularizado por um vasto aparelho anastomótico situado no interior do mesentério. As artérias jejunais e ileais, ramos da artéria mesentérica superior, após formarem as arcadas intestinais terminam em vasos retos que se originam isoladamente ou aos pares. Chegando a margem intestinal, cada vaso reto desliza por baixo da túnica serosa e penetra na parede intestinal, situando-se na submucosa. A circunferência intestinal fica, portanto, encerrada em uma pinça arterial. Na submucosa também são descritas anastomoses longitudinais e transversais. De fato deve-se considerar cada vaso reto como uma artéria fisiologicamente terminal (Latarjet, 1993).

1.5.3 Anatomia vascular do jejuno de rato

De acordo com Anthony (1997), ao considerarmos um corte transversal da parede intestinal como representado a face do relógio, as margens mesentérica e contra-mesentérica representariam seis e doze horas, respectivamente. Os ramos diretos da artéria marginal peri-intestinal perfuram a parede do intestino de forma alternada e no sentido de cinco e sete horas, aproximadamente, para suprir as paredes anterior e posterior. Geralmente estas artérias entram na túnica muscular obliquamente e bifurcam na submucosa as três e nove horas. Os dois ramos provenientes

desta bifurcação passam para o lado anti-mesentérico onde eles se unem com os ramos do lado oposto da parede intestinal formando o plexo mucoso colateral. A taxa de vascularização da margem mesentérica é significativamente menor do que o lado anti-mesentérico.

1.6 Implicações dos mecanismos de agressão e defesa intestinais

1.6.1 Mecanismos de agressão

As células sofrem alterações bioquímicas e morfológicas seqüenciais conforme a lesão progride e finalmente sofrem necrose. Todas as influências estressantes e nocivas exercem seus efeitos em nível molecular ou bioquímico. Existe um período de tempo entre o início do estresse e o desenvolvimento das alterações morfológicas da lesão celular ou morte. Como seria de se esperar, as manifestações morfológicas na necrose levam mais tempo para se desenvolver do que as do dano reversível. A degeneração reversível pode ser reconhecida pelo edema celular e a degeneração gordurosa.

A necrose se refere ao espectro de alterações morfológicas que ocorre após a morte celular. As células necróticas são incapazes de manter a integridade das membranas e seu conteúdo geralmente extravasa. Isso pode causar inflamação no tecido adjacente.

Um infarto é uma área de necrose isquêmica causada pela oclusão do suprimento arterial ou da drenagem venosa no tecido. Os infartos vermelhos (hemorrágicos) ocorrem com oclusões venosas nos tecidos de circulações duplas, permitindo o fluxo sanguíneo do vaso desobstruído para a zona necrótica (Kumar et al., 2005).

1.6.2 Mecanismos de defesa intestinais

A resposta inflamatória está intimamente ligada ao processo de reparo.

Processo inflamatório agudo básico

A inflamação é uma resposta complexa do tecido conjuntivo vascularizado. O processo de inflamação gerado pela presença de um agente provocador de lesão leva a um acúmulo de fluídos nos tecidos extras vasculares, cuja resposta é de fundamental importância para a proteção de células e tecidos.

As ações características da inflamação aguda são:

- O aumento do fluxo sanguíneo local e o aumento da permeabilidade vascular que permite a saída de proteínas plasmáticas e de leucócitos formando o edema.
- O leucócito no lúmen passa pelo processo de marginação, rolamento e adesão do endotélio. Os receptores de adesão envolvidos são:

selectinas, imunoglobulinas, integrinas e glicoproteínas. Posteriormente os leucócitos atravessam o vaso sanguíneo pela diapedese e migram para tecidos intersticiais pelo estímulo quimiotático. Os agentes quimiotáticos endógenos incluem vários mediadores químicos: componentes do sistema complemento, especialmente C5a; produtos da via lipoxigenase, especialmente o leucotrieno B4 e citocinas, especialmente as que pertencem à família das quimocinas (por exemplo, interleucina 8). Os microorganismos, produtos de células necróticas, complexos antígeno-anticorpo e citocinas, incluindo fatores quimiotáticos, induzem várias respostas nos leucócitos. As respostas funcionais da ativação leucocitária incluem: produção de metabólitos do ácido aracidônico a partir de fosfolípidios, resultante da ativação da fosfolipase A2 pelo aumento do cálcio intracelular e por outros sinais. Desgranulação e secreção de enzimas lisossômicas e ativação do surto oxidativo. Secreção de citocinas, o que amplifica e regula as reações inflamatórias. Os macrófagos são as principais fontes das citocinas envolvidas na inflamação, mas também pode haver contribuição de mastócitos e outros leucócitos. Esses produtos são capazes de causar lesão do endotélio e nos tecidos e podem, assim, amplificar os efeitos da lesão inicial (Kumar et al., 2005).

Mediadores químicos da inflamação

Muitos mediadores químicos foram identificados, porém ainda sem o conhecimento exato do seu funcionamento. Entre eles podemos citar:

- Aminas vasoativas, histamina e serotonina.
- Proteínas plasmáticas que realizam a ativação do sistema do complemento, sendo 20 proteínas que atuam tanto na imunidade natural quanto na adquirida.
- Sistema das cininas que gera peptídios vasoativos a partir de proteínas plasmáticas, os cininogênios, através de proteases específicas chamadas calicreínas. A ativação deste sistema resulta na liberação de bradicinina, que aumenta a permeabilidade vascular.
- Sistema da coagulação que está intimamente relacionado à inflamação que culmina com a ativação da trombina e na formação de fibrina.
- Metabólitos do ácido aracdônico, também chamados de eicosanóides. São sintetizados por duas classes principais de enzimas: as ciclooxigenases (prostaglandinas e tromboxanos) e as lipoxigenases (leucotrienos e lipoxinas). Os eicosanóides se unem aos receptores ligados à proteína G de vários tipos celulares e pode mediar virtualmente cada passo da inflamação.
- Fator de ativação das plaquetas (PAF) é outro mediador derivado dos fosfolipídios. Além da estimulação das plaquetas, o PAF causa vasoconstrição e broncoconstrição e em doses extremamente baixas, estimula a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular com

uma potência 100 a 10.000 vezes maior que a histamina. Ele também causa um aumento da adesão leucocitária ao endotélio, quimiotaxia, desgranulação e surto oxidativo. Assim, o PAF pode desencadear a maioria dos principais acontecimentos da inflamação.

- Fator de necrose tumoral e interleucina-1 são as duas principais citocinas que participam do processo inflamatório. Suas ações mais importantes na inflamação são seus efeitos no endotélio, nos leucócitos e fibroblastos, e a indução de reações sistêmicas da fase aguda.
- Quimiocinas são proteínas pequenas que agem primariamente como quimiotáticos para tipos específicos de leucócitos.
- Óxido nítrico é um potente vasodilatador devido sua ação no músculo liso vascular. Além disso, reduz a agregação e a adesão plaquetária e funciona como regulador endógeno que reduz as respostas inflamatórias.
- Componentes lisossomais dos leucócitos, os grânulos lisossomais específicos dos leucócitos, menores, contém lisozima, collagenase, gelatinase, lactoferrina, ativador do plasminogênio, histaminase e fosfatase alcalina. Os grânulos azurófilos maiores possuem mieloperoxidase, fatores bactericidas, hidrolases ácidas e várias proteases neutras. Estas diversas enzimas têm funções diferentes.
- Neuropeptídeos, assim como as aminas vasoativas e os eicosanóides, participam da deflagração e propagação da resposta inflamatória.

A regeneração celular refere-se ao crescimento de células e tecidos para substituir estruturas perdidas. As células-tronco são caracterizadas por sua capacidade prolongada de auto-renovação e por sua replicação assimétrica.

1.7 Utilização de antioxidantes

Recentemente, muitos estudos têm examinado a efetividade dos carreadores de radicais livres de inibir ou prevenir, limitar ou reparar a lesão oxidativa que ocorre durante a isquemia/reperfusão.

A enzima superóxido dismutase (SOD) que apresenta ação de varredura de radicais livres de oxigênio, atenua significativamente o aumento da permeabilidade capilar induzido pela isquemia (Parks et al., 1983). A administração exógena desta enzima tem demonstrado efeito protetor contra as lesões de isquemia/reperfusão em vários órgãos (Granger et al., 1986).

Gondolesi et al (1998), utilizaram α -Tocoferol em modelos de isquemia/reperfusão em transplante hepático de fígado e verificaram diminuição de lesão dos hepatócitos.

A utilização de etil piruvato, um intermediário chave no metabolismo celular, que atua como carreador de radicais reativos de oxigênio, melhorou a lesão de isquemia/reperfusão no fígado pela diminuição de necrose e apoptose de células hepáticas em transplante experimental (Tsung et al. 2005).

Finkelstein et al. (1988) realizaram uma análise comparativa de três agentes antioxidantes na proteção do intestino delgado de ratos submetidos a 30 minutos de isquemia normotérmica. Eles utilizaram alopurinol (inibidor da xantina oxidase), desferoxamina (carreador de radicais livres e quelante de ferro) e trifluoperazina (inibidor da calmodulina), e concluíram que todos os agentes testados apresentaram efeito protetor importante.

1.8 Utilização do ácido ascórbico

O ácido ascórbico é uma vitamina hidrossolúvel, que age como um cofator na biossíntese do colágeno, carnitina, catecolamina e peptídeos neurohormonais. O ácido ascórbico também previne efeitos lesivos de oxidantes pela redução das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio para a estabilização de moléculas. Esta vitamina perde elétrons nas reações biossintéticas ou antioxidantes (Wilson, 2002). Sua ação antioxidante também é determinada pela capacidade de varredura dos radicais livres, carreando radicais peroxilas, antes que estas substâncias destrutivas comprometam as estruturas lipídicas. O ácido ascórbico também age juntamente com tocoferol e a enzima glutatíon peroxidase para interromper a cadeia de reações de radicais livres (Cathcart, 1985).

Ozaki et al. (1995) testando ácido ascórbico em ratos obtiveram uma boa preservação da integridade celular do fígado, estimados pela dosagem das enzimas hepáticas e um bom estado energético do tecido hepático pós-isquêmico, verificados pelos níveis de ATP.

Demertzis et al. (2000) verificaram que a aplicação de ácido ascórbico apresentou melhora dos parâmetros respiratórios e diminuição da ativação de polimorfonucleares nos pulmões de modelos experimentais de autotransplante em carneiros.

Os antioxidantes Trolox (análogo hidrossolúvel da vitamina E) e ácido ascórbico protegeram o coração da lesão de isquemia/reperfusão. A administração desta solução para as coelhas exerceu um efeito benéfico na lesão do miocárdio, após hipóxia fetal induzida pela isquemia uterina (Tan et al., 1996).

Gunel et al. (1998) demonstraram que as drogas antioxidantes: ácido ascórbico e o manitol podem atenuar as lesões intestinais após a reperfusão ao constatarem a diminuição tecidual dos níveis de malondialdeído e a elevação de glutatião.

Nakamura et al. (1998) demonstraram que a administração de ácido ascórbico por via peritonial em ratos atuou como substância antioxidante e suprimiu em dose dependente, a peroxidação lipídica após reperfusão. A avaliação bioquímica foi realizada pela dosagem de glutatião e atividade da glutaminase. A análise histológica foi baseada no sistema de Muller et al. (1994), que aparentemente demonstrou lesões menos marcantes nos animais que receberam ácido ascórbico. Nesta análise, a intensidade das lesões patológicas, após 20 minutos de reperfusão foi graduada de 0 a 3, baseadas nos seguintes parâmetros: (1) infiltração celular, (2) separação do epitélio das vilosidades da lâmina própria, (3) aspecto das bases das vilosidades/criptas e (4) edema.

1.9 Métodos de avaliações de lesões

Devido a grande quantidade de sistemas existentes para gradação das lesões de isquemia/reperfusão, Quaedekers (2000) propõe que avaliações descritivas das lesões sejam baseadas na associação dos sistemas de Chiu (1970) e Park (1990). Esta análise verifica alterações desde o topo das vilosidades intestinais, onde geralmente começam as lesões, até as criptas mais profundas. São anotados graus de 1 a 8 de acordo com os danos encontrados.

Sistema PARK/CHIU

PARK	CHIU
0. mucosa normal	
1. espaço subepitelial no topo das vilosidades	
2. expansão do espaço subepitelial com levantamento moderado	6. lesão das criptas mais profundas
3. desnudação de alguns topos de vilosidades	7. enfartamento transmucoso
4. vilosidades desnudadas e dilatação capilar	8. enfartamento transmural
5. desintegração da lâmina própria	

Shah et al. (1997) demonstraram a indução de apoptose pela lesão de isquemia/reperfusão do intestino, a qual inicia com uma hora de reperfusão do tecido previamente preservado em solução de Universidade de Wisconsin modificada. Isto tem implicações terapêuticas relevantes. Contrariamente a necrose, apoptose é um processo ativo com reguladores genéticos e efetores bioquímicos, substâncias que atuem nestes reguladores especificamente, poderão direcionar a prevenção ou atenuação da lesão de isquemia/reperfusão.

Outros métodos utilizados para a avaliação das lesões da mucosa do intestino delgado são: determinação da taxa de permeabilidade intestinal, pela contagem de radioatividade; análise imunohistológica IgG, IgM e complementos (Willian, 1999). Uso de parâmetros bioquímicos para análise qualitativa e quantitativa como: dosagem de interleucinas (Farmer et al., 2005), medida de mieloperoxidase como índice de acumulação de neutrófilos (Krawisz et al., 1984) e medida de desidrogenase láctica (Filez et al., 1987).

1.10 Justificativa do estudo

A ação antioxidante do ácido ascórbico no intestino delgado, submetido a isquemia/reperfusão, foi comprovada pelos estudos de Gunel et al. (1998) e Nakamura et al. (1998), utilizando dosagens bioquímicas. O método de análise histológico, utilizado por Nakamura (1998),

aparentemente apresenta uma diminuição das lesões, porém o estudo não apresentou uma avaliação quantitativa.

O ácido ascórbico tem se mostrado promissor como um agente protetor da lesão induzida pela formação de radicais livres, mas ainda não se tem na literatura um método objetivo para a avaliação do grau e a extensão das lesões. Existem diversos métodos para a graduação da lesão. Alguns pesquisadores utilizam métodos qualitativos ou subjetivos. Outros pesquisadores tem avaliado a expressão da lesão por cruzes ou análise semi-quantitativa. Para verificar-se a importância do ácido ascórbico e explorar a relação quantitativa entre ácido ascórbico e grau/extensão de lesão por isquemia/perfusão, optamos por um modelo experimental em ratos.

Este estudo busca através de um modelo factível validar um antioxidante de ampla utilização, o ácido ascórbico, como agente atenuante das lesões de isquemia/reperfusão intestinal.

O levantamento da literatura expõe vários problemas quando tentamos avaliar o efeito benéfico de um antioxidante ou outra substância na prevenção de injúria de isquemia/reperfusão no intestino. Existe uma lista enorme de drogas antioxidantes com potencialidade de utilização para a prevenção de danos. Os ensaios terapêuticos têm usado estas drogas em diferentes concentrações, seguindo vários períodos de isquemia e reperfusão, com diferentes vias de administração e em vários estágios do processo (administração da droga pré-isquemia, durante a isquemia e durante a reperfusão). Também são utilizados diferentes métodos de quantificações de lesão causadas no intestino. Como consequência é difícil

comparar com efetividade cada um dos agentes. Entretanto, a literatura tem demonstrado que os antioxidantes exercem um efeito benéfico na prevenção de lesões de isquemia/reperfusão.

A proposta deste estudo foi validar os efeitos protetores do ácido ascórbico em um modelo experimental de isquemia/reperfusão no intestino delgado utilizando como ferramenta a morfometria.

A relevância da problemática envolvida, associada à necessidade de estabelecimento de metodologia eficaz de avaliação de lesão e pesquisa de uma substância que atenuie as lesões de isquemia/reperfusão foi o propósito do trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Validar os efeitos protetores do ácido ascórbico em um modelo experimental de isquemia/reperfusão no intestino delgado utilizando como ferramenta a morfometria.

2.2 Específicos

- Estabelecimento de um modelo animal em ratos para estudo da isquemia/reperfusão;
- Analisar as diferenças qualitativas entre as lesões histológicas obtidas na isquemia/reperfusão;
- Analisar a extensão do envolvimento intestinal através de análise quantitativa;
- Analisar diferenças de lesões nas margens mesentérica e contra-mesentérica da mucosa intestinal;
- Analisar diferenças de lesão na isquemia/reperfusão e isquemia;
- Comparar o efeito do ácido ascórbico como protetor na distribuição das lesões.

3 MÉTODOS

3.1 Amostra

Foram utilizados cinqüenta ratos machos (*Rattus Norvergicus Albinus*, Rodentia Mammalia) da linhagem Wistar isogênicos (WN/N/UNOESTE), com peso entre 240 a 300 gramas e idade de três meses, procedentes do Biotério Central.

Os animais ficaram alojados no Laboratório de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Unoeste, no dia anterior ao experimento, distribuídos em gaiolas medindo 30x40x25 centímetros, com aeração natural, sendo alimentado com ração e água “*ad libitrum*”.

3.2 Delineamento experimental

Os 50 animais foram distribuídos em cinco grupos com 10 animais cada:

- grupo isquemia (controle) submetido à isquemia mesentérica por 40 minutos;
- grupo isquemia/reperusão (controle) submetido a isquemia mesentérica por 40 minutos e reperusão por 30 minutos;

- grupo isquemia/ácido ascórbico (experimento) recebeu ácido ascórbico e foi submetido a isquemia mesentérica por 40 minutos;
- grupo IRA (experimento) recebeu ácido ascórbico e foi submetido a isquemia/reperfusão;
- grupo S (*sham*) animais foram anestesiados e operados, mas sem indução de isquemia/reperfusão intestinal.

Na figura 4 encontra-se esquematizado o delineamento experimental.

Figura 4. Esquema do delineamento experimental. Sendo n = número de animais, I/R = isquemia/reperfusão, I = isquemia, AAs = ácido ascórbico

3.3 Etapas experimentais

Os animais foram anestesiados com 0,15ml da solução de xylasina (Dopaser, Laboratório Calier do Brasil - 20 mg/ml) e ketamina (Dopalen, Agribands do Brasil, Paulínea, SP - 50 mg/ml), na proporção de 1,6/5 por via intramuscular.

3.3.1 Procedimento operatório

Após injeção da solução anestésica, foram realizados testes de estímulos dolorosos em patas para verificação do nível de profundidade anestésica. Os animais foram posicionados em decúbito dorsal e fixados a prancha operatória por tiras elásticas.

Os animais do grupo experimento (isquemia/ácido ascórbico e isquemia/reperfusão/ácido ascórbico) receberam 2 ml de solução a 0,2 mmol/Kg de ácido ascórbico (Sigma Chemical Co St. Louis. Mo. USA), via intraperitoneal, 1 hora antes do procedimento operatório. Os animais do grupo controle (isquemia e isquemia/reperfusão) receberam 2 ml de soro fisiológico, também por via peritoneal.

A técnica operatória foi padronizada para ambos os grupos. Abertura da cavidade abdominal realizada através de incisão mediana de aproximadamente 6 cm. As alças intestinais foram exteriorizadas à direita, permitindo acesso aos vasos do retro peritônio. A temperatura retal foi monitorada e mantida em torno de 36.6°C a 37.7°C, utilizando se termômetro digital. Para o controle da temperatura as alças intestinais foram cobertas com gazes úmidas, onde se aplicava soro fisiológico aquecido ou não. Os animais que apresentaram hiper ou hipotermia persistentes foram excluídos do estudo.

A artéria mesentérica superior (cranial) foi dissecada na sua origem e ocluída por 40 minutos, com um pequeno clampe vascular, submetendo assim o intestino delgado à isquemia. O intestino foi

cuidadosamente recolocado na cavidade abdominal e a incisão coberta com gaze úmida.

Figura 5. Ilustra o procedimento operatório, com colocação do clampe na artéria mesentérica superior.

Figura 6. Fotografia dos micros clampes utilizados para oclusão da artéria mesentérica superior.

O abdome foi abordado novamente ao final do período isquêmico para retirada de 3 cm de jejuno a 10 cm do ângulo de Treitz. No grupo isquemia/reperfusão o intestino foi submetido à isquemia por 40 minutos e reperfusão pela soltura do clampe por mais 30 minutos. Ao término do período de reperfusão foi retirado segmento de intestino delgado. A luz intestinal foi lavada com solução de formol, semelhante ao produto da fixação.

Os animais ainda sob efeito anestésico foram sacrificados pela secção da veia cava inferior.

3.4 Morfologia

Para a avaliação das lesões histológicas provocadas pela isquemia e isquemia/reperfusão nos grupos controle e experimento foram utilizados os seguintes critérios:

3.4.1 Análise histológica

Após a colheita do material os tecidos foram processados com técnicas histológicas padronizadas que incluíram a fixação em formalina tamponada a 10% por um período de 24 horas, desidratação, embebição em parafina, inclusão em blocos de parafina e a seguir cortes de 4 μ m de espessura. Foram utilizados 6 cortes para cada animal. Posteriormente, os fragmentos de ambos os grupos foram estendidos e emergidos em banho-

maria, colados em lâminas de vidro e corados pela hematoxilina e eosina (Luna,1968). As lâminas de ambos os grupos foram codificadas.

3.4.2 Análise morfométrica

A análise histológica foi realizada pela leitura de 10 campos diferentes das lâminas, nas margens mesentérica e contra-mesentérica da mucosa do jejuno. A margem mesentérica foi determinada pela identificação de estruturas vasculares do mesentério. Foi considerada margem contra-mesentérica a borda contra lateral. Para o exame histológico foi utilizado microscópio ótico de luz da marca NIKON, utilizando-se aumentos de 100, 200 e 400 vezes.

Figura 7. Fotografia de mucosa intestinal superposta por esquema de retículo acoplado à lente do microscópio ótico.

A análise histológica morfométrica foi baseada segundo as técnicas propostas por Gundersen (1988). A fração de área das alterações encontradas nas estruturas da mucosa do intestino delgado foi determinada pela contagem de números de pontos que se projetaram nas estruturas a estudar divididos pelo número total de pontos projetados no tecido intestinal. Foram determinadas fração de área dos vilos, criptas, necrose dos vilos, infarto hemorrágico e células inflamatórias. Do total das células inflamatórias quantificou-se separadamente leucócitos polimorfonucleares, linfócitos, plasmócitos e eosinófilos. A quantificação foi realizada com um retículo coerente, constituído por 100 pontos e 50 retas de comprimento conhecido, acoplado à lente do microscópio óptico (esquema da figura 7).

3.5 Análise estatística

Antes de proceder-se à análise estatística formal, foram testadas as normalidades dos dados pelo Teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias. Quando houve normalidade, porém diferença entre as variâncias, utilizou-se ANOVA com teste Dunnet. Quando as variâncias foram iguais, utilizou-se o teste Tukey adotando um α global de 5%. Test t de Student foi usado para comparar as variáveis morfológicas obtidas nos grupos controle (isquemia e isquemia/reperfusão) e experimento (isquemia/ácido ascórbico e isquemia/reperfusão/ácido ascórbico). As margens mesentérica e contra-mesentérica foram também comparadas

entre os grupos para as mesmas variáveis estudadas pelo Teste t pareado. Em todos os casos o nível de significância foi estabelecido para 5%. Foi utilizado o pacote estatístico SPSS V.10.0.

4 RESULTADOS

4.1 Macroscopia

O aspecto macroscópico das lesões demonstrou um caráter segmentar de comprometimento intestinal nos diversos grupos, onde se notava áreas vermelho-vinhosas ao lado de áreas de cor rósea. Estas lesões segmentares de menor ou maior intensidade eram semelhantes em todos os grupos do experimento.

Figura 8. Aspecto macroscópico das lesões intestinais nos vários grupos estudados.

4.2 Histologia

O estudo microscópico mostrou diferenças de resultados analisados pela morfometria dos grupos entre si, e também das alterações morfológicas na mucosa do intestino delgado, quando comparado com o grupo *sham*, que preserva intacta as estruturas intestinais.

A avaliação histológica comparando o intestino normal do grupo *sham* com os grupo controle (isquemia e isquemia/reperfusão) e o grupo experimento (isquemia e isquemia/reperfusão com administração prévia de ácido ascórbico) demonstrou alterações morfológicas na parede intestinal.

Na figura 9 é apresentada em detalhe uma vilosidade do intestino delgado normal (grupo *sham*) com preservação da histoarquitetura.

Figura 9. Detalhe da histologia das vilosidades do intestino delgado de um animal do grupo *sham*. O revestimento das vilosidades é composto por epitélio cilíndrico com células muco-secretora isocrômicas e isomórficas (H&E-200X).

Em contraste, no grupo de animais controle ou experimento, cujos intestinos foram submetidos à isquemia, a histoarquitetura da mucosa é frontalmente modificada pela necrose comprometendo o topo das vilosidades.

Figura 10. Detalhe da histologia das vilosidades do intestino delgado de um animal do grupo isquemia mostrando distorções na arquitetura por necrose e denudação celular no topo das vilosidades. H&E 200X.

Já no período subsequente à isquemia com a necrose instalada, promove-se o restabelecimento da circulação, ou seja da reperfusão, propiciando-se o terreno para a instalação da hemorragia, configurando o quadro histológico do infarto hemorrágico intestinal.

Figura 11. Detalhe histológico da necrose coagulativa e hemorragia das vilosidades em um animal do grupo isquemia/reperfusão configurando o quadro de infarto hemorrágico do intestino delgado. H&E (200X).

Em decorrência às lesões necrosantes e hemorrágicas nas vilosidades, que constituem o substrato histo-anatômico do infarto vermelho ou hemorrágico do intestino delgado, ocorrem a diminuição no comprimento das vilosidades, porém ainda se mantendo a histoarquitetura das criptas (fig. 12).

Figura 12. Visão panorâmica da histologia do intestino delgado de rato submetido à isquemia/reperfusão onde se vislumbra a diminuição no comprimento das vilosidades em decorrência às lesões necrosantes e hemorrágicas. H&E (100X).

4.3 Análise morfométrica

Medidas e gráficos dos parâmetros morfológicos intestinais distribuídos de acordo com os grupos de animais são apresentadas na Tabela 1 e Figuras 13 a 15 .

Tabela 1. Resumo dos parâmetros intestinais medidos (médias, mínimos e máximos) e comparações entre os grupos com testes Anova ou Teste T Independente

		GRUPOS					Valor de p
		Sham	Isquemia	Isquemia/ Reperusão	Isquemia/ Ácido ascórbico	Isquemia/ Reperusão/ Ácido ascórbico	
Parâmetros		Fração de Área (Média, Mínimo e Máximo) (%)					
Vilos	M	,93 (.82-1,0)	,57 (.39-,76)	,53 (.40-,88)	,62 (.43-,75)	,60 (.39-,94)	0,47
	CM	,90 (.85-,95)	,45 (.16-,72)*	,34 (.17-,66)*	,48 (.31-,76)	,40 (.22-,81)	0,04
Criptas	M	,97 (.80-1,2)	,82 (.57-1,1)	,94 (.80-1,2)	,93 (.79-1,2)	,92 (.70-1,2)	0,19
	CM	,97 (.79-1,1)	,84 (.59-1,3)	,96 (.63-1,2)	,80 (.62-,94)	,85 (.70-1,2)	0,06
Necrose vilos Intestinais	M	0 (0-0)	,15 (.03-,34)*	,13 (0-0,3)	,04 (0-,11)*	,08 (0-0,3)	0,004
	CM	0 (0-0)	,32 (.25-,38)*	,32 (.12-,48)	,19 (.07-,38)*	,24 (.04-,37)	0,01
Infarto hemorrágico	M	0 (0-0)	,18 (0-,45)	,25 (0-,65)	,15 (0-,35)	,20 (.02-,56)	0,5
	CM	0 (0-0)	,42 (.22-,76) *	,63 (.36-1,2) *	,48 (.19-,99)	,36 (.09-,95)**	0,009
Células inflamatórias	M	23 (17-46)	29 (20-36)	27 (22,6 -37)	29 (17-32)	30 (20-41)	0,05
	CM	24 (18-30)	28 (20-35)	29 (22-46)	28 (14- 46)	30 (20-43)	0,2

Abreviações: M mesentérica; AM, contra mesentérica

* diferenças estatisticamente significantes entre dois grupos (Teste t de Student)

* diferenças entre os grupos isquemia X isquemia/reperusão (p=0,01) (teste t de Student)

* * diferenças entre os grupos isquemia/reperusão X isquemia/reperusão ácido ascórbico (p=0,009) (teste t de Student)

diferenças entre todos grupos (Anova)

As alterações morfológicas observadas no intestino delgado (Figuras 9 a 12) coincidiram com as diferenças quantitativas nos cinco grupos de animais.

Na Tabela 1 podem-se apreciar as medidas e variações mínimas e máximas da variável vilo intestinal. A fração de área dos vilos intestinais no grupo isquemia/reperfusão foi significativamente menor que no grupo isquemia (34% vs 45%; $p=0.04$; Tabela 1). A Figura 13 ilustra graficamente a distribuição da variável fração de área dos vilos intestinais entre os vários grupos estudados.

Figura 13. Fração de área de vilos intestinais mesentérico e contra-mesentérico, estratificados de acordo com os grupos de animais estudados.

Na Tabela 1 podem-se apreciar as medidas e variações mínimas e máximas da variável infarto hemorrágico de acordo com os grupos estudados. A fração de área do infarto hemorrágico intestinal na margem contra mesentérica no grupo isquemia/reperfusão foi significativamente maior que no grupo isquemia (63% vs 42%; $p=0.01$; Tabela 1). A Figura 14 ilustra graficamente a distribuição da variável fração de área de infarto hemorrágico intestinal entre os vários grupos estudados. O grupo isquemia/reperfusão também apresentou maior fração de área de infarto hemorrágico na margem contra mesentérica do que o grupo isquemia/reperfusão/ácido ascórbico (0.63% vs 0.36%; $p=0.009$) (Figura 14).

Figura 14. Fração de área de infarto hemorrágico mesentérico e contra-mesentérico, estratificada de acordo com os grupos de animais estudados.

Na Tabela 1 podem-se apreciar as medidas e variações mínimas e máximas da variável necrose no topo dos vilos de acordo com os grupos estudados. No grupo isquemia foi estatisticamente significativa a maior fração de área de necrose presente no topo dos vilos de ambas margens mesentérica e contra mesentérica quando comparadas aos espécimens intestinais do grupo isquemia/ácido ascórbico (0.15% vs 0.04%, $p=0.004$; 0.32% vs 0.19%; $p=0.01$) (Figura 15).

Figura 15. Fração de área de necrose dos vilos intestinais nas bordas mesentérica e contra-mesentérica, estratificada de acordo com os grupos de animais estudados.

As frações de áreas ocupadas no intestino delgado pelas criptas e células inflamatórias não foram diferentes entre os grupos controle e ácido ascórbico.

Surpreendentemente e coincidindo com as alterações morfológicas visualizadas, a fração de área menor dos vilos intestinais e a fração maior de infarto hemorrágico e necrose das vilosidades estiveram presentes em maiores proporções na margem contra mesentérica em, relação à mesentérica nos grupos experimento e controle (Figuras 16 e 17).

Figura 16. Fotografia da mucosa intestinal da margem mesentérica, com vasos sanguíneos no mesentério.

Figura 17. Fotomicrografia da mucosa intestinal da margem contra-mesentérica, demonstrando lesões de mucosa.

5 DISCUSSÃO

A isquemia mesentérica seguida de reperfusão ocorre devido a doenças vasculares, hemorragia ou trauma. É caracterizado por desarranjo local e sistêmico com alta morbidade e mortalidade apesar de cuidados intensivos (Nakao et al., 1996). Uma variedade de doenças cirúrgicas causa interrupção intermitente do suprimento sanguíneo. O restabelecimento do fluxo de sangue é uma condição para a sobrevivência dos tecidos, entretanto a reperfusão também está associada com a lesão tissular do órgão envolvido, bem como o desenvolvimento de complicações sistêmicas e risco de vida (Poggetti et al., 1992).

Os modelos experimentais utilizados procuram simular estas situações clínicas e cirúrgicas.

5.1 O período de reperfusão aumenta a lesão intestinal

A isquemia pode causar dano no intestino e a subsequente reperfusão acarreta piora da lesão intestinal (Kong et al., 1998). Isto ocorre devido à produção de radicais reativos de oxigênio na reperfusão e desencadeamento de vários outros eventos. Park et al. (1990) demonstraram que a maior parte da lesão tecidual produzida pelo modelo experimental de indução de hipotensão regional ocorre no período de reperfusão.

Segundo Boros et al. (2002) o grau de lesão da mucosa foi significativamente aumentado durante a reperfusão após 15 minutos de isquemia. Inicialmente, a obstrução das vênulas foi no topo das vilosidades seguindo sua própria oclusão arterial com subsequente destruição dos tecidos adjacente durante a reperfusão. A lesão da rede de mucosa durante o período de reperfusão pode ser muito significativa na fase inicial de completa oclusão da circulação mesentérica.

Shah et al. (1997) observaram um significativo aumento da apoptose das células das criptas e das células descamadas das vilosidades após isotransplante e uma hora de reperfusão comparadas com o tecido normal ou de preservação. O nosso trabalho também constatou lesões mais intensas na reperfusão. Dentre os parâmetros avaliados para caracterizar as lesões constatamos diminuição do comprimento das vilosidades e a presença de infarto hemorrágico mais intenso ao longo da margem contra-mesentérica do intestino no grupo isquemia/reperfusão (IR) comparado com o grupo isquemia (I).

5.2 Influência do tempo na lesão intestinal de isquemia/reperfusão

Os estudos morfométricos mostram que as lesões mais evidentes ocorrem no período de 10 a 30 minutos de revascularização, parecendo não estar inicialmente relacionado ao tempo da duração da isquemia (Montoya et al., 1990).

Não existe uma padronização quanto aos períodos de isquemia e reperfusão havendo nos trabalhos grandes variações do tempo de isquemia e reperfusão. O período de 45 minutos de isquemia produz destruição da mucosa, mas com pouco efeito na musculatura lisa (Willians et al., 1999; Zingarelli et al., 2001). Baseado nestes trabalhos, com objetivo de obtermos lesões evidentes sem destruição maciça, mas cientes de que as lesões mínimas não necessitam de tratamento (Farmer et al., 2005), foram aplicados 40 minutos de isquemia e 30 minutos de reperfusão.

A morfologia e a cronologia da isquemia intestinal do homem e do rato foram investigadas. Wagner e Gabbert (1983) demonstraram que a morfogênese do dano da mucosa intestinal do homem não difere da do rato. Entretanto, existe uma diferença no curso do tempo da lesão da mucosa intestinal que é de crucial importância em termos de terapêutica. Na mucosa do intestino delgado de rato, a primeira alteração observada é a separação e a descamação do epitélio do topo das vilosidades, que já é possível de ser observada após absoluta isquemia com duração de 15 minutos. No humano a mesma lesão ocorre somente após 4 horas. A comparação com a completa necrose da mucosa do intestino delgado foi detectada após 7 horas de isquemia no rato e 44 horas no homem.

5.3 Fatores implicados na alteração de lesão do intestino

Notamos macroscopicamente no presente estudo que os animais submetidos à isquemia/reperfusão apresentavam as alças

intestinais com sinais de sofrimento não uniforme; com alterações de coloração, motilidade e variação do calibre.

O caráter descontínuo e a variabilidade que apresentam as lesões têm sido causa de avaliações subjetivas de gravidade das lesões, de modo que resulta numa dificuldade para comparar os diferentes trabalhos.

A influência de fatores intercorrentes, como a gravidade, a posição das alças antes do episódio isquêmico, a manipulação e recolocação na cavidade podem provocar lesões intestinais não uniformes (Montoya et al., 1990). Neste trabalho procuramos seguir os mesmos parâmetros de procedimento operatório, tempo, dosagem das drogas, peso e espécie. Para minimizar o efeito do aspecto descontínuo das alterações intestinais foram examinados vários cortes do segmento intestinal ressecado.

5.4 Outros métodos de avaliações de lesões

Devido ao fato da participação da agregação de neutrófilos polimorfonucleares no processo inflamatório, alguns métodos são utilizados. Segundo Krawisz et al. (1984), a metodologia de mensuração da atividade de mieloperoxidase (MPO) expressa melhor a quantificação do índice de agregação de neutrófilos. Utilizamos a contagem de leucócitos para avaliar os diferentes grupos deste estudo, e observamos que estes não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

A dosagem de níveis de malondialdeído (MDA) é utilizada para avaliação da peroxidação lipídica, como apresentada por Gunel et al. (1998) na avaliação da associação de ácido ascórbico e manitol para constatação da sua ação antioxidante.

A localização imunohistoquímica para ICAM-1 (molécula de adesão intercelular) cuja expressão pode ser aumentada por vários mediadores inflamatórios como TNF - α e IL-1 β (Cuzzocrea et al., 2004).

A avaliação do índice de permeabilidade intestinal pela contagem radioativa permite análise quantitativa da permeabilidade, constituindo uma importante alternativa para avaliação do edema (Willians et al., 1999).

A morfometria histológica também permitiria a determinação do edema se a mucosa intestinal não apresentasse grande área de descamação, processo este que inicia pelo topo das vilosidades. No nosso trabalho o edema foi indiretamente avaliado pela medida das áreas das criptas que não apresentaram diferenças estatisticamente significante entre os grupos. O edema das vilosidades não foi medido devido ao variável grau de destruição do topo das vilosidades.

5.5 Avaliação quantitativa morfométrica

A nível prático a estereologia é uma ferramenta precisa para obtenção de informações sobre estruturas microscópicas tridimensionais,

baseada principalmente nas observações feitas das secções. Secções bi-dimensionais contêm informações quantitativas sobre estruturas tri-dimensionais somente no senso estatístico. O método utilizado de análise morfométrica pode ser considerado imparcial e eficiente, “sem desvios sistemáticos do valor verdadeiro e com pouca variabilidade” (Gundersen et al., 1988). No presente trabalho, foi utilizado o mesmo método tendo sido possível determinar fração da área de necrose, infarto hemorrágico, comprimento das vilosidades e contagem de células inflamatórias da mucosa do jejuno.

Os outros métodos de análise histológica de lesão de isquemia/reperfusão intestinal são baseados em análises subjetivas ou semiquantitativas, que fornecem poucos dados quantitativos para uma análise estatística.

5.6 Outras terapêuticas experimentais testadas

Apesar das conseqüências clínicas das lesões de isquemia/reperfusão estarem bem documentadas, o sucesso terapêutico e as estratégias preventivas permanecem falhos.

A lesão de isquemia/reperfusão constitui uma seqüência de mecanismos complexos. As causas potenciais para o desenvolvimento e progressão incluem adesão, ativação e seqüestração de neutrófilos polimorfonucleares (Moore et al., 1994; Kong et al., 1998), liberação de

citocinas pró-inflamatórias (Willians et al., 1999; Nilsson et al., 1994) e radicais reativos de oxigênio.

Baseados nestas evidências, inúmeras terapêuticas experimentais têm sido testados em modelos animais com sucesso para atenuar as lesões produzidas pela isquemia e reperfusão. As estratégias utilizadas incluem várias modalidades como: pré-condicionamento isquêmico (Mallick et al., 2004), hipotermia intra-isquêmica, uso de anti-complemento (Arumugan et al., 2002a), antiinflamatórios (Takeyoshi et al., 1999) e (Arumugan et al., 2002b), citocinas proinflamatórias IL-2, per-fluorocarbonos, P-selectin glicoproteína (Farmer et al., 2005), solução de aminoácidos, lipoproteínas de alta densidade (Cuzzocrea et al., 2005), imunoglobulinas, imunossuppressores, suplementação com glicina (Lee et al., 2001), alimentação enteral (Salehi et al., 2004), antagonista de receptor B2 da bradicinina (Arakawa et al., 2005), antagonista do fator ativador das plaquetas: Lexipafan (Sun et al., 2000) e BN 52021 (Mustafá et al., 2003) e antioxidantes (Nilsson et al., 1994).

A administração de antiinflamatórios citocinas (IL-10) tem sido sugerida para minimizar a resposta inflamatória e a disseminação da lesão de isquemia/reperfusão para órgãos distantes (Nussler et al., 2003). Porém, há evidências de que a resposta inflamatória deve ser necessária para a recuperação do organismo após isquemia/reperfusão ou septicemia (Kox et al., 2000).

A utilização de inibidores seletivos da ciclooxigenase-2 exerceu um efeito protetor na lesão de isquemia/reperfusão do intestino pela supressão da produção de prostanoide (Kawata et al., 2003).

A aplicação terapêutica de hipotermia intra-isquêmica preveniu a ativação do fator nuclear kappa-B, modulando as proteínas do stress oxidativo durante a isquemia/reperfusão mesentérica (Hassoum et al., 2002).

A imunoglobulina (IVIG) inibe o aumento do vazamento capilar na isquemia/reperfusão mesentérica e coincide com a redução de deposição de C3 no tecido pulmonar. O efeito benéfico da IVIG pode ser devido à habilidade para remover produtos deletéricos (Anderson et al., 2005).

Os imunossupressores Tacrolimus (FK 506) e Ciclosporina A mantêm a microcirculação e protegem o tecido da lesão de isquemia e reperfusão suprimindo a produção e liberação do vasoconstrictor Endotelina-1 (ET-1), (Soda et al., 1999).

Ulinastatin (UTI) pode exercer efeito protetor contra a lesão de isquemia/reperfusão no transplante de intestino delgado, promovendo a recuperação estrutural e funcional do enxerto com lesão moderada causada pelo período de preservação fria (Xiaoqiao et al., 2001).

Segundo Schemeling et al. (1994), ao utilizarem diclofenaco de sódio obtiveram um efeito citoprotetor significativo, suplantando o uso de antioxidantes convencionais: desferoxamina e superóxido dismutase mais catalase. O aminoesteróide, U74389F tem demonstrado efeito protetor no intestino delgado de ratos nas lesões de isquemia quente ou fria, sua administração reduz tanto a peroxidação lipídica como a permeabilidade da mucosa (Stojadinovic et al., 1999).

Uma solução de aminoácidos foi recentemente desenvolvida demonstrando um efeito protetor significativo no modelo de isquemia/reperfusão do intestino delgado que foi tratado com esta solução durante a preservação fria. Isto leva a possibilidade da utilização clínica desta solução durante a preservação do intestino delgado (Salehi et al., 2005).

5.7 Outros antioxidantes utilizados

Devido à participação dos radicais livres no desencadeamento da cascata de eventos promotores de lesões e nos componentes da membrana celular, causando peroxidação lipídica, degradação do colágeno e do ácido hialurônico (Granger et al., 1986), inúmeras estratégias com utilização de antioxidantes têm sido testadas. Alguns dos antioxidantes estudados foram: allopurinol (Feza et al., 1996), superóxido dismutase (Bilbao et al., 1991; Deshnukh et al., 1997; Osborne et al., 1994), L-glutamina, quelantes de ferro, N-acetilcisteína, etanol, tocoferol (Yoshida et al., 1998), pentoxifilina, piruvato (Cicalese et al., 1996) e ácido ascórbico (Nakamura et al., 1997).

A Solução salina hipertônica (HTS) tem demonstrado efeito modulador da resposta inflamatória da isquemia/reperfusão do intestino pós-choque, sua proteção no desenvolvimento dos eventos deve-se em parte a pela participação da heme oxigenase-1 (HO-1), (Attuwaybi et al., 2004).

A utilização do aminoácido L-glutamina em ratos submetido à isquemia/reperfusão do intestino mostrou efeito protetor nas lesões. Este efeito foi considerado em parte pela participação da glutamina na regulação de moléculas como a heme oxigenase-1 e glutatíão via atividade celular antioxidante (Yasunara, 2001). Outro estudo utilizando a L-glutamina, concluiu que este aminoácido pode aliviar e mesmo prevenir as lesões intestinais, atenuando a morte celular programada e promovendo a sua reepitelização (Masuko, 2002).

A Melatonina tem sido considerada um antioxidante que previne lesões de isquemia e reperfusão em vários tecidos. Ozacmak et al. (2005) observaram o efeito protetor da melatonina na atividade contrátil do íleo de rato submetido à lesão oxidativa, bem como a restauração da quantidade de malondialdeído e glutatíão para os níveis anteriores do controle. Ates et al. (2004) também observaram efeito protetor da melatonina aplicado mesmo antes da isquemia ou da reperfusão. Segundo Ustundag et al. (2000) a melatonina parece exercer a atividade antioxidante no trato gastrointestinal pela estimulação do superóxido dismutase (SOD) e glutatíão (GSH).

Segundo os nossos levantamentos, encontramos somente dois estudos com a utilização de ácido ascórbico e lesão de isquemia/reperfusão no intestino delgado de ratos. Um dos estudos o ácido ascórbico foi utilizado em associação com manitol (Gunel et al., 1998).

No estudo de Nakamura et al. (1997), a avaliação de lesões foi baseada na dosagem bioquímica, onde verificou se que o ácido ascórbico exerceu ação antioxidante com diminuição da peroxidação lipídica e níveis

de glutatão. Para a avaliação histológica foi utilizado o critério de Muller modificado que analisa a infiltração celular, separação do epitélio das vilosidades da lâmina própria, aspecto das bases das vilosidades/criptas, edema, onde foi constatada uma aparente melhora das lesões.

Estes estudos foram os primeiros a demonstrarem alterações morfológicas significativas no intestino delgado submetido à isquemia/reperfusão.

Nossos resultados sugerem que o método de avaliação morfométrica fornece mais informações quantitativas do que a avaliação patológica de rotina.

5.8 Lesões intestinais de isquemia/reperfusão na margem contra-mesentérica

A necrose dos vilos e infarto hemorrágico da lâmina própria foram mais evidentes ao longo da margem contra-mesentérica, com conseqüente diminuição do comprimento das vilosidades da mucosa do intestino em ambos os grupos de isquemia e isquemia/reperfusão. A explicação pode ser baseada na anatomia vascular do intestino de rato, como descrito anteriormente por Anthony (1997). A densidade vascular na margem contra-mesentérica é maior que na borda mesentérica. Estes resultados podem demonstrar que a margem contra-mesentérica é mais

susceptível a lesões provocadas pelas situações clínicas ou cirúrgicas que acarretem hipóxia e também reperfusão.

5.9 Benefício do ácido ascórbico também na isquemia

Pelo exposto, a utilização do antioxidante teria seu efeito benéfico somente após o período de reperfusão, quando ocorre a produção e liberação de radicais livres de oxigênio. Entretanto, em nosso trabalho verificamos o efeito benéfico do ácido ascórbico também no grupo que foi submetido somente ao período de isquemia, na qual observamos uma diminuição de necrose das vilosidades no grupo tratado com ácido ascórbico.

Del Maestro (1980) considera que durante a anóxia, como ocorre nas isquemias intestinais e transplante de órgãos; os radicais livres não deveriam exercer grandes alterações às células e tecidos, tendo em vista que, a geração de radicais livres na ausência de oxigênio é bastante limitada. As mitocôndrias não se encontram envolvidas na redução de oxigênio e a oxidação do ácido aracdônico não pode ocorrer. Porém o que ocorre de certo com os mecanismos de varredura de radicais livres durante a isquemia ainda é desconhecido.

Uma das possíveis explicações para este resultado seria que durante o período de isquemia prolongada, poderia ocorrer a liberação de radicais livres, como foi demonstrado por Cizova et al. (2004) no seu estudo,

onde períodos com duração de 30 a 90 minutos apresentava um aumento do parâmetro total de radicais ligados a antioxidantes (TRAP), sendo que o ascorbato e o urato contribuem consideravelmente com o valor do TRAP.

Em nosso trabalho o intestino foi submetido a 40 minutos de isquemia, intervalo de tempo citado por Cizova et al. (2004).

Outro argumento a favor da ação de antioxidantes na isquemia é a presença de substâncias antioxidantes nas soluções de preservação, portanto durante a isquemia. Massberg et al. (1998), em seu estudo, utilizando solução de preservação Carolina Rinse, que contém em sua fórmula, componentes antioxidantes como: allopurinol, desferoxamina e glutatíão, observaram no enxerto de intestino delgado de rato antes da reperfusão, um número reduzido de leucócitos, dispostos laminarmente ou aderidos ao endotélio. Esta solução atenua a lesão microvascular pós-isquêmica do tecido intestinal preservado.

A diminuição de lesões também no grupo isquemia com a utilização de ácido ascórbico, pode ser atribuído a diversos mecanismos, como fatores mecânicos, bioquímicos e hormonais intercorrentes com o acidente isquêmico (Robinson et al., 1981).

Também o conteúdo intestinal químico e bacteriano exerce efeito importante sobre a rapidez da necrose conseqüente da oclusão da artéria mesentérica superior (Plonka et al., 1989).

5.10 Possibilidades de utilização de ácido ascórbico

O ácido ascórbico pode melhorar alguns indicadores da lesão de isquemia/reperfusão (quente) no intestino delgado de ratos. Isto aponta para a possibilidade da utilização do ácido ascórbico em cirurgias ou processos patológicos nos quais estão incluídos os períodos de isquemia/reperfusão.

Pesquisas recentes demonstram a possibilidade promissora do uso de simples antioxidantes para o tratamento da enterite necrosante em crianças, baseadas nos estudos de modelos experimentais de enterite necrosante em ratos, utilizando: Selenium, vitamina C e Vitamina E Minocha et al. (1999).

O propósito deste estudo foi testar a eficácia do ácido ascórbico na prevenção das lesões de isquemia/reperfusão no intestino delgado devido às evidências de que os radicais reativos de oxigênio são os responsáveis pelo desencadeamento das reações inflamatórias e também por serem os mais importantes componentes da lesão tecidual após reperfusão de órgãos isquêmicos.

O efeito do ácido ascórbico nas lesões causadas pelo processo isquemia/reperfusão no intestino delgado pode disponibilizar um recurso simples, podendo contribuir com a diminuição da prevalência de complicações nos transplantes intestinais e na melhoria das patologias na qual este mecanismo esteja presente.

Em algumas situações clínicas não serão possíveis o uso profilático de antioxidantes. Entretanto, poderemos obter um significativo benefício, se o período de isquemia puder ser previsto, (como a administração da droga após o transplante, mas antes da reperusão) ou se aplicado logo após o diagnóstico do episódio isquêmico (como torção intestinal, infarto ou embolismo/trombose).

Novas pesquisas nas quais incluam triagens randomizadas e prospectivas serão importantes para corroborar com os nossos achados quantitativos, bem como para estender as avaliações para outros antioxidantes em novos modelos de ratos. Estudos comparativos entre os antioxidantes e outros métodos poderão determinar a melhor opção para a atenuação das lesões de isquemia e reperusão.

A meta é encontrar estratégias que aperfeiçoem a perfusão intestinal e controlar as etapas do processo inflamatório, causadora dos efeitos lesivos no intestino, nas várias patologias clínicas e cirúrgicas onde o fenômeno da isquemia/reperusão esteja presente.

6 CONCLUSÕES

Geral

Este estudo permitiu verificar o efeito do ácido ascórbico nas lesões induzidas por isquemia/reperfusão.

Específicas

O modelo animal em ratos mostrou-se adequado para observação das lesões intestinais induzidas por isquemia/reperfusão.

O estudo analisou as diferenças entre as lesões histológicas.

A análise quantitativa foi adequada para avaliar a extensão das lesões isquêmicas induzidas e o efeito protetor do ácido ascórbico.

As lesões por isquemia/reperfusão são mais intensas na margem contra-mesentérica do intestino delgado.

A isquemia/reperfusão causa mais lesão do que a isquemia.

O ácido ascórbico atenua as lesões da mucosa intestinal submetido à isquemia/reperfusão.

7 REFERÊNCIAS

Anderson J, Fleming SD, Rehring GC, Tsokos GC, Basta M, Shea-Donohue, T. Intravenous immunoglobulin attenuate mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Clin. Immunology*. 114(2): 137-46, 2005.

Anthony A, Pounder RE, Dhillon AP, Wakefield AJ. Vascular anatomy defines sites of indomethacin induced jejunal ulceration along the mesenteric margin. *Gut*. 47: 763-70, 1997.

Arakawa K, Takeyoshi I, Akao Y, Totsuka O, Matsumoto K, Morishita Y. Bradykinin B2 receptor antagonist FR 173657 ameliorates small bowel ischemia-reperfusion injury in dogs. *Dig. Disease & Sciences*. 50(1): 27-36, 2005.

Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Reid RC, Fairlie DP, Taylor SS. Protective effect of a new C5 receptor antagonist against ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine. *J. Surg. Res*. 103: 260-67, 2002.

Ates B, Yilmaz I, Geckil H, Iraz M, Birincioglu M, Fiskin K. Protective role of melatonin given either before ischemia or prior to reperfusion on intestinal ischemia-reperfusion damage. *J. of Pineal Reserch*. 37(3): 149-52, 2004.

Attuwaybi B., Kozar RA, Gates KS, Moore-Olufemi S, Sato N, Weisbrodt N W, Moore FA. Hypertonic Saline Prevents Inflammation, Injury, and Impaired Intestinal Transit after Gut Ischemia/Reperfusion by Inducing Heme Oxygenase 1 Enzyme. *J. of Trauma*. 56: 749-59, 2004.

Bilbao J, Garcia-Alonso L, Portugal V, Barceló P, Ortiz J, Méndez J. Utilidad terapêutica de fármacos antioxidantes em el síndrome de reperfusion intestinal experimental. *Re. Esp. Enf. Digest*. 80: 237-41, 1991.

Boros M, Takaichi S, Hatanaka K. Ischemic Time-Dependent Microvascular Changes and reperfusion Ijury in the rat Small Intestine. *J. of Surg. Res*. 59:311-20, 1995.

Cathcart RF. Vitamin C: The nontoxic, nonrate-limited, antioxidant free radical scavenger. *Med. Hypotheses*. 18: 61-77, 1985.

Chiu CJ, Hagkund U, Bulkley GB. *Arch. Surg*. v.101, p. 478, 1970.

Cicalese L, Rastellini C, Rao AS, Stanko RT. Pyruvate prevents mucosal reperfusion injury, oxygen free-radical production, and neutrophil infiltration after small bowel preservation and transplantation. *The Am. J. of Surg*. 171(1): 97-101, 1996.

Cizova H, Lojek A, Kubala L, Ciz K. The Effect of Intestinal Ischemia Duration on Changes in Plasma Antioxidant Defense Status in Rats. *Physiol. Res.* 53: 523-31, 2004.

Collard CD, Simon G. Pathophysiology, clinical manifestation, and prevention of ischemia –reperfusion injury. *Anesthesiology.* 94(6): 1133-8, 2001.

Cuzzocrea S, Dugo L, Patel NSA, Di Paola R, Cockerill GW, Genovese T, Thimermann C. Hight-density lipoproteins reduce the intestinal damage associated with ischemia/reperfusion and colits. *Shock.* 21: 345-51, 2004

Del Maestro RF. An aproach to free radicals in medicine and bilogy. *Acta Phisiol. Scand.* 492: 153-68, 1980.

Demerttzi S, Scherer M, Langer F, Dwenger A, Hausen B, Schafers HJ. Ascorbic acid for amelioration of reperfusion injury in a lung auto transplantation model in sheep. *Ann. of Thoracic Surg.* 70(5): 1684-9, 2000.

Deshnukh DR, Mirochnitchenko O, Ghole VS, Agnese D, Shah PC, Redell M, Brolin RE, Inouye M. Intestinal ischemia and reperfusion injury in transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. *Am. J. Phhysiol. Cell. Physiol.* 273: 1130-35, 1997.

Farmer DG, Shen X, Amersi F, Anselmo D, Ma JP, Ke B, Gao F, Dry S, Fernandez S, Shaw GD, Mcdiarmid SV, Bursutil RW, Kupie-Weglinski J. CD62 blockade with P-Selectin Glycoprotein ligant-imunoglobulin fusion protein reduces ischemia-reperfusion injury after rat intestinal transplantation. *Transplant.* 79: 44-51, 2005.

Feza MA, Mustafa O, Orhan Y, Murat G, Tanju A, Mustafa Y, Gonca A. The effect of allopurinol pretreatment on intestinal hypoperfusion encountered after correction of intestinal volvulus. *J. Ped. Surg.* 31(9): 1205-07, 1996.

Filez L, Stalmans W, Pennincks F, Kerremns R, Geboes K. The use of biochemical parameters a qualitative and quantitative assessment of ischemic damage to small-intestine mucosa. *Biosci. Rep.* 7(12):917-23, 1987.

Finkeestein L, Toledo-Pereira LH, Castilho M, Castellanos J. Comparative analysis of pharmacological agents following small bowel ischemia. *Transplant. Proc.* 20(5): 1043-4. 1988.

Fuh KC, Meneshian A, Patel CB, Takiar V, Bulkley G. Signal transduction by reactive oxygen species: Alternative paradigms for signaling specificity. *Surg.* 131(6): 601-12, 2002.

Gies H. Oxidative stress, from basic research to clinical application. *Am. J. of Med.* 91. 36, 31-8, 1991.

Gondolesi GE, Semplici AM, Luna GC, Vidal MS, Arauz MS, Raimondi JC, Dreizzen E, Fassi JC. α -Tocoferol reduces hepatocyte ischemia-reperfusion injury in an isolated rat liver model. *Tranplant. Proc.* 30: 2885-8, 1998.

Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA. Ischemic-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta. Physiol. Scand.* 126: 47, 1986.

Grisham MB. oxidants and free radicals in inflammatory bowel disease. *Lancet.* 344: 859-61, 1994.

Gundersen HJG, Bendtsen TF, Korbo L, Marcussen N, Moller A, Nielsen K, Nyengaaed JR, Pakkenberg B, Sorensen FB, Vesterby A, West MJ. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* 96: 379-394, 1988.

Gunel E, Caglayan F, Caglayan O, Dilsiz A, Duman S, Aktan M. Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. *J. Ped. Surg.* 33: 1536-9, 1998.

Hassoum HT, Kozar RA, Kone BC, Safi HHH. J, Moore FA. Intraischemic hypothermia differentially modulates oxidative stress proteins during mesenteric ischemia/reperfusion. *Surg.* 132(2):369-76, 2002.

Hirata Y, Taguchi T, Nakao M, Yamada T, Hirose R, Suita S. The relationship between the adenine nucleotide metabolism and the conversion of xantine oxidase enzyme system in ischemia-reperfusion of the rat small intestine. *J. of Ped. Surg.* 31(9): 1199-204, 1996.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. Cap. 15, p.299-313: Intestino delgado.

Katz SM, Sun S, Schechner RS, Tellis VA, AL ER, Greenstein SM. Improved small intestinal preservation after Lazaroid U-14384 G. treatment and cold storage in University of Wisconsin Solution. *Transplantation.* 59: 694-8, 1995.

Kawata K, Takeyoshi I, Iwanami K, Sunose Y, Tsutsumi H, Ohwada S, Matsumoto K, Morishita Y. The effects of a selective cyclooxygenase-2 inhibitor on small bowel ischemia-reperfusion injury. *Hepato-Gastroenterology.* 50(54): 1970-40, 2003.

Kelly N, Friend K, Boyle P, Zhang XR, Wong C, Hackam DJ, Zamora R, Ford HR, Upperman JS. The role of the glutathione antioxidant system in gut barrier failure in a rodent model of experimental necrotizing enterocolitis. *Surgery.* 2004,136: 557-66.

Kong S, Blennerhassett LR, Hell KA, McCauley RD, Hall JC. Ischemia-reperfusion injury to the intestine. *Aust. N. Z. J. Surg.* 68(8): 554-61, 1998.

Korthuis RJ, Granger DN. Reactive oxygen's metabolites, neutrophils, and pathogenesis of ischemic-tissue; reperfusion. *Clin. Cardiol.* 16 (suppl. I). 191-126, 1993.

Kox WJ, Volk T, Kox SN. Immunomodulatory therapy in sepsis. *Intensive Care Med.* 26: 124-28, 2000.

Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal intestinal inflammatory base on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat hamster models. *Gastroenterology.* 87: 1344-50, 1984.

Kumar K, Abbas A, Fausto N, Bases patológicas das doenças. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. Cap.1, p. 3-49: Adaptação, dano e morte celular.

Laskowski I, Pratschke J, Wilhelm MJ. Molecular and Cellular events associated with ischemia/reperfusion injury. *Ann. Transplant.* 5(4) 29-35, 2000.

Latarjet M, Liard AR. Anatomia humana. 2ª ed. São Paulo: Medicina Panamericana; 1989. v.2, Cap. 23, p. 1556-69: Intestino delgado. Jejunó-íleo.

Lee MA, Mccauley RD, Kong S, Hall JC. Pretreatment with glycine reduces the severity of warm intestinal ischemic-reperfusion injury in the rat. *Ann. Plast. Surg.* 46(3): 320-26, 2001.

Luna LG. *Manual of histologie scanning methods of the A.F.I.P.* 3.ed. New York, 1969. p. 370.

Mallick IH, Yang W, Winslet MC, Seifalian AM. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Dig. Dis. and Sci.* 49(9):1359-77, 2004.

Massberg S, Leiderer R, Gonzales AP, Menger MD, Messmer K. Carolina rinse attenuates potischemic microvascular onjury in rat small bowell isografts. *Surg.* 62(20) 181-66, 1998.

Masuko Y. Impact of stress response genes induced by L-glutamine on warm ischemia and reperfusion injury in the rat small intestine. *Hokkaido Igaku Zasshi.* 77(2): 69-83, 2002.

McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. of Med.* 312(3): 159-63, 1985.

Minocha A, Doig CM. Free Oxygen Radicals in Pathogenesis of Neonatal Necrotising Enterocolits: The Role of Antioxidants. *J. Indian Association of Pediatric Surgeons.* 4: 178-85, 1999.

- Montoya IG, Lacorzana JO, Amuchastegui AB, Porras VP, Marin JM. Cuatificación de lesiones em el síndrome de revascularización intestinal de la rata: método morfométrico. *Gastroenterologia y hepatologia* 13: 274-9, 1990.
- Moore EE, Moore FA, Franciose RJ, Kim EJ, Biffl WL, Banerjee A. The postischemic gut serves as priming bed for circulating neutrophils that provoke multiple organ failure. *J. Trauma*. 37: 881, 1994.
- Morris JB, Bulkley GB, Haglund U, Cadenas E, Sies H. The direct real-time Demonstration of oxygen free radical generation at reperfusion following ischemia in rat small intestine. *Gastroenterology*. 92: 1541, 1987.
- Muller AR, Nalesnik M, Platz KP, Langrehr JM, Hoffman RA, Schraut WH. Evaluetion of preservation conditions and various solutions for small bowel preservation. *Transplantation*. 57: 649-655, 1994.
- Mustafá A, Ahmet G, Husein B, Ibrahim T. The effects of glucose-insulin-potassium solution and BN 52021 in intestinal ischemia-reperfusion injury. *Vasc. and Endovascular Surg*. 37: 345, 2003.
- Nakamura M, Ozaki M, Fuchinoue S, Teraoka S, Ota K. Ascorbic acid prevents ischemia/reperfusion injury in rat small intestine. *Tranpl. Int*. 10: 89-95, 1997.
- Nakao M, Hirat Y, Taguchi T, Yamada T, Rahman MS, Suita S. Energy metabolism and xantine oxidase enzyme system during ischemia reperfusion in rat small intestine. *Transplant. Proc*. 28: 2614, 1996.
- Narita K, Kuwabara Y, Fujii Y, Lung injury after intestinal ischemia-reperfusion may be avoided by the reduced absorption of locally produced cytokines. *Surg. Today*. 34: 937-42, 2004.
- Nilsson UA, Schoenberg MH, Aneman A, Poch B, Magadum S, Beger HG, Lundgren O. Free radicals and pathogenesis during ischemia and reperfusion of the cat small intestine. *Gastroenterology*. 106: 629-36, 1994.
- Nussler NC, Muller AR, Weidenbach H, Vergopoulos A, Platz KP, Volk H, Neuhaus P, Nussleer AK. IL-10 Icreases Tissue Injury After Seletive Intestinal Ischemia/Reperfusion. *Ann. of Surg*. 238: 49-58, 2003.
- Osborne DL, Aw TY, Cepinskas G, Kvietys PR, Patsy R. Development of ischemia/reperfusion tolerance in the rat small intestine: An epithelium-independent event. *J. Clin. Invest*. 94(5): 1910-18, 1994.
- Ozacmak VH, Sayan H, Arslan SO, Altaner S, Aktas RG. Protective effect of melatonin on contractile activity and oxidative injury induced by ischemia and reperfusion of rat ileum. *Life Sciences*. 76(14): 1575-88, 2005.

- Ozaki M, Fuchinoue S, Teraoka S, Ota K. The in vivo cytoprotection of ascorbic acid against ischemia/reoxygenation injury of rat liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 318(2): 439-45, 1995.
- Park PO, Williams TK, Beckman JS. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery.* 107: 574-80, 1990.
- Parks DA, Granger DN. Contribution of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Gastrointestinal and Liver Physiology.* 250: 749, 1986.
- Plonka AJ, Schentag JJ, Messinger S, Adelman NH, Francis KL, Williams JS. Effects of enteral and intravenous antimicrobial treatment on survival following intestinal ischemia in rats. *J. Surg. Res.* 46: 216-20, 1989.
- Poggetti RS, Moore FA, Moore EE. Simultaneous liver and lung injury following gut ischemia is mediated by xantine oxidase. *J. Trauma.* 32: 723-28, 1992.
- Quaedackers RJ, Beuk R, Bennet L, Charlton MGA, Gunn AJ, Heineman E. An evaluation of methods for grading histologic injury following ischemia/reperfusion on the small bowel. *Transpl. Proc.* 32: 1307-10, 2000.
- Redan JA, Rush BF, Lysz TW, Smith S, Machiedo GW. Organ distribution of gut-derived bacteria caused by bowel manipulation or ischemia. *Am. J. Surg.* 159:85-9, 1990.
- Reilly PM, Schiller HJ, Bulkey GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am. J. Surg.* 161: 488 -503, 1991.
- Robinson JW, Mirkovitch V, Winistofer B, Saegesser F. Response of intestinal mucosa to ischemia. *Gut.* 22: 512-27, 1981.
- Salehi P, Madsen K, Zhu J, Castilho E, Ávila J, Lakey JRT, Churchill TA. Alleviating ischemia-reperfusion injury in small bowel. *Am. J. Transplant.* 4(5): 728-37, 2004.
- Schmeling DJ, Caty MG, Oldham KT, Guice KS. Cytoprotection by diclofenac sodium after intestinal ischemia/reperfusion injury. *J. Pediatr. Surg.* 29: 1044-8, 1994.
- Shah KA, Shurey S, Green CJ. Characterization of apoptosis in intestinal ischaemia-reperfusion injury- a light and electron microscopic study. *International. J. of Exp. Pathology.* 78(5): 355-63, 1997.
- Shinya T. Reactive oxygenspecies-induced molecular damage and its application in pathology. *Pathology International.* 49: 91-102, 1999.

Soda Y, el-Assal ON, Yu L, Nagasue N. Supressed endothelin-1 production by FK 505 and cyclosporin A in ischemia/reperfusion of rat small intestine. *Surgery*. 25: 23-32, 1999.

Southard JH, Den Butter B, Marsh DC, Lindell S, Belzer FO. The role of oxygen free radicals in organ preservation. *Klin. Wochenschr.* v. 69, p.1073-76, 1991.

Stojadinovic A, Smallrige R, Nath J, Ding X, Shea-Donohue T. Anti-inflammatory effects of U4359F in a rat model of intestinal ischemia/reperfusion injury. *Crit. Care Med.* 27(4): 764-70, 1999.

Sun Z, Wang X, Deng X, Lasson A, Soltesz V, Borjesson A, Anderson R. Beneficial effects of lexipafant, a PAF antagonist on gut barrier dysfunction caused by intestinal ischemia and reperfusion in rats. *Dig. Surg.* 17(1): 57-65, 2000.

Tan S, Liu YY, Nielsen VG, Skinner K, Kirk KA, Baldwin ST, Parks DA. Maternal infusion of antioxidants (Trolox and ascorbic acid) protects the fetal heart in rabbit fetal hypoxia. *Ped. Research.* 39: 499-503, 1996.

Takeyoshi I, Iwanami K, Ohwada S, Kawashima Y. Effect of FR167653 on small bowel ischemia-reperfusion injury in dogs. *Dig. Dis. and Sci.* 44(11): 2334-43, 1999.

Thompson ABR, Keelan M, Thiesen A, Clandin MT, Ropeleski M, Wil GE. Small Bowel Rewiew: Diseases of the Small Intestine. *Dig. Dis and Sci.* 46(12); 2555-66, 2001.

Tsung A, Kaizu T, Nakao A, Shao L, Bucher B, Fink M, Murase N, Geller DA. Ethyl Pyruvate Ameliorates Liver Ischemia-Reperfusion Injury by Decreasing Hepatic Necrosis and Apoptosis. *Transpl.* 79: 196-204, 2005.

Ustundag B, Kazez A, Demirbag M, Canatan H, Halifeoglu I, Ozercan IH. Peotective effect of melatonin on antioxidative system in experimental ischemia-reperfusion of rat small intestine. *Cell. Physiol. Biochem.* 10(4): 229-36, 2000.

Wagner R, Gabber H. Morfhology and chronology of ischemic mucosal changes in the small intestine. A light and electron microscopic investigation. *Klin Wochenshr.* 61(12):593-9, 1983.

Willians JP, Pechet TTV, Weiser MR, Reid R, Kobzik FD, Moore, FD, Carroll MC, Hechtman HB. Intestinal reperfusion injury is mediated by IgM and Complement. *J. Appl. Physiol.* 86: 938-42, 1999.

Wilson JX. The physiological role of dehydroascorbic acid. *FEBS Letters.* 527:5-9,2002.

Yassin MM, Barros DAA, Parks G, Abdulkadir AS, Halliday I, Rowlandas BJ. Mortality following lower limb ischaemia-reperfusion: A systemic inflammatory response?. *World J. Surg.* 20: 961-7, 1996.

Yasuhara M. L-Glutamine-induced heme oxygenase-1 protects small intestine from warm ischemia and reperfusion injury in the rat. *Hokkaido Igaku Zasshi.* 76(1): 21-34, 2001.

Yoshida WB, Alasio T, Mazziota R, Qin F, Kashani M, Lee S, Dardik H. Effect of α -tocoferol, taurine and selenium on attenuation of ischemia-reperfusion injury of splanchnic organs. *Cardiovasc. Surg.* 6(2): 178-87, 1998.

Xiaoqiao Z, Rong M, Zhigang Y, Young D, Xihong F, Jingzhong F. Protective effect of ulinastatin against ischemia-reperfusion injury in rat small bowel transplantation. *Transpl. Proc.* 36(5): 1564-6, 2004.

Xu D, Qi L, Guillory D, Cruz N, Berg R, Deith EA. Mechanisms of endotoxin-induced intestinal injury in a hyper dynamic model of sepsis. *J. Trauma.* 34: 676-83, 1993.

Zigarelli B, Yang Z, Hake PW, Denenberg A, Wong HR. Absence of endogenous interleukin 10 enhance early stress response during post-ischemic injury in mice intestine. *Gut.* 48(5): 610-22, 2001.

Zhi-young S, Dong YL, Wang XH. Bacterial translocation and multiple system organ failure in bowel ischemia and reperfusion. *J. Trauma.* 32: 148-53, 1992.

Apêndices

Sao Paulo, Brazil, 20th June, 2005

Dear Editor of

Journal of Surgical Research

E-mail: journalofsurgicalresearch@hmc.psu.edu

Web site: <http://jsr.edmgr.com>

Please find enclosed the Special Article “**QUANTITATIVE EVALUATION OF ASCORBIC ACID EFFECTS IN AN INTESTINAL ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY MURINE MODEL**”, which is being submitted for possible publication in **Journal of Surgical Research**. The work represents original investigation and will not be submitted to any other Journal until your decision is made.

Faithfully yours,

Vera Luiza Capelozzi

Associate Professor of Lung Pathology

Department of Pathology

São Paulo Medical School

QUANTITATIVE EVALUATION OF ASCORBIC ACID EFFECTS IN AN INTESTINAL ISCHEMIA/REPERFUSION INJURY MURINE MODEL

Oscar Haruo Higa, MD; Edwin Roger Parra, MD, Cecília Farhat,
Statistician, Rita de Cassia B L Higa, MD, PhD, and Vera Luiza Capelozzi,
MD, PhD.

Department of Pathology, São Paulo University Medical School, Brazil.

Running head: Ascorbic acid decrease small intestine ischemia/reperfusion
injury

This study was supported by the following Brazilian agencies: the National
Council for Scientific and Technological Development [**CNPq 300430/95-7;**
CNPq 141898/2001-1]; the Research Support Foundation of São Paulo
State [**FAPESP 2000/14336-0**]; and the Medical Research Laboratories [**LIM**
05], Clinical Hospital, Medicine School, São Paulo University.

Address for correspondence and reprint requests:

Vera Luiza Capelozzi, MD, PhD

Departamento de Patologia

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Av. Dr. Arnaldo 455; ZIP Code - 01246-903, São Paulo, SP, Brazil.

Phone - (5511)3066-7427; FAX - (5511)5096-0761

E-mail – vcapellozzi@lim05.fm.usp.br

ABSTRACT

Background. Ascorbic acid has shown promise to attenuate intestinal ischemia-reperfusion (I/R) injury. In this study, we sought to validate the importance of ascorbic acid and to study the relationships between ascorbic acid and several morphological changes after intestinal injury in rats.

Materials and Methods. We examined morphological changes in small intestine of wistar rats after 40 minutes of ischemia (group I), ischemia followed by 30 min of reperfusion (group IR), ischemia with ascorbic acid (group IA) and ischemia followed by reperfusion and ascorbic acid (IRA). We used morphometry to evaluate the amount of villous architecture, crypts, necrosis, hemorrhagic infarcts and inflammatory cells at mesenteric and anti mesenteric margin of the small intestine.

Results. Ascorbic acid caused a significant reduction of anti mesenteric villous hemorrhagic infarct ($p<0.05$) of small intestine after ischemia followed by reperfusion as well as reduction of villous necrosis at both margins after ischemia ($p<0.05$). These lesions found in small intestine were more prominent along the anti mesenteric margin.

Conclusions. This study demonstrates a strong correlation between quantitative evaluation of intestinal damage improvement and the protector effect of ascorbic acid.

Key Words: small intestine; ischemia-reperfusion; morphometric analysis; ascorbic acid; ischemia; villous necrosis; hemorrhagic infarct; mesenteric margin; anti mesenteric margin; experimental surgical; murine model.

INTRODUCTION

Intestinal ischemia is involved in numerous clinical situations including acute mesenteric ischemia, intestinal obstruction, incarcerated hernia, small intestine volvulus, and necrotizing enterocolites. Particularly, the consequences of mesenteric ischemia are devastating to the patient and usually result in diarrhea, mal absorption, short small intestine syndrome and even death [1]. In addition, ischemia/reperfusion injury has been a key factor of successful organ preservation in small intestine transplantation [2]. Thus, there is great interest in ways to verify protector mechanisms of extensive small intestine lesion that shorten the patient's life, and for the transplantation treatment to be effective, we must identify and to protect small intestine morphological changes after ischemia/reperfusion injury. In this regard, many have been studied morphological aspects in small intestine to discover what might relate to pathogenesis and protection of the resulting injury [3]. Because free oxygen radicals are involved in ischemia/reperfusion injury [4,5,6], a group of anti-oxidants has been targeted as potential useful protector agents against morphological changes found after small intestine injury [7]. Among these, ascorbic acid has shown promise. Ascorbic acid is a water-soluble vitamin which has reducing and chelating properties, it also wash out free radicals produced during ischemia, and by ascorbic acid scavenging of reactive oxygen intermediates are produced immediately after reperfusion [8]. Nakamura's study previously demonstrated that ascorbic acid prevents ischemia/reperfusion injury [9], but there is uncertainty about

quantitation of morphological changes reported. In fact, there have been nearly as many ways to report morphological changes induced by ischemia/reperfusion in organs. Some have used binary cut points to define the presence of morphological changes. Others have expressed the morphological changes in crosses, and yet, others have expressed it semi quantitatively [10]. The present study was designed to validate ascorbic acid protection against ischemia/reperfusion injury in the small intestine at the mesenteric and anti mesenteric margins. Then, we studied this therapeutic agent in a murine model of small intestine ischemia/reperfusion to explore the quantitative relationship between this factor and morphological changes, and herein report our results.

MATERIALS AND METHODS

Intestinal I/R Injury Model

Ethics committee of São Paulo University previously approved this study. The experimental design was as follows: fifty male Wistar rats weighting between 240 and 300g divided in three groups: Sham (n=10), control (ischemia n= 10; ischemia/reperfusion n= 10) and ascorbic acid (ischemia/ascorbic acid n=10; ischemia/reperfusion/ascorbic acid n= 10). The animals from control groups received 2 ml of sterile saline solution (0.9% NaCl) into the peritoneal cavity one hour before the operation. The ascorbic acid groups underwent to the same experimental procedure but with intraperitoneally injection of 2 mmol/Kg of ascorbic acid (Sigma Chemical Co

St. Louis. Mo. USA) suspended in saline solution (total volume = 2ml). The animals were anesthetized with a intramuscular injection of 80 mg/Kg ketamine (Dopalen, Agribands of Brazil, Paulínea, SP) and 10 mg/kg of xylazine (Dopaser, Calier Laboratory of Brazil).

After upper midline laparotomy, the superior mesenteric artery was exposed in ischemia group and occluded for 40 minutes using a micro vascular clamp. The occluding clamp was removed after 40 minutes for reperfusion period during 30 additional minutes in ischemia/reperfusion group. At the end of each procedure the rats were sacrificed and the proximal jejunum was processed using standard histological techniques including formalin fixation, dehydration and paraffin embedding, then cut in 4 µm sections and stained with H&E. The normal intestine sample of the sham group didn't receive artery manipulation.

Morphometric Study

We performed morphometric analysis at the mesenteric and anti mesenteric small intestine margins. It was used an integrating eyepiece with a coherent system made of a 100-point grid consisting of 50 lines of known length coupled to a light microscope (Figure 1). The examination of the sections was a cascade progressive sampling approach at X100 and X400 magnification, and the fractional areas of villous, crypts, necrosis, hemorrhagic infarcts and inflammatory cells were determined by the point-counting technique [11]. We counted all points falling on these components and divided by the total number of points. We averaged this over 10 no

overlapping microscopic fields in each case to obtain a result as a percentage of measured structures as shown below.

Fractional Area (A/A) = $Z_p(\text{struct.})/Z_p(\text{sect})$
--

where Fractional Area (A/A) is equal to the number of points overlying villous, crypts, necrosis and inflammatory cells [$Z_p(\text{struct.})$] divided by the total number overlying small intestine tissue [$Z_p(\text{sect.})$].

Statistical Analysis

The normality of the data (Kolmogorov-Smirnov test with Lilliefors's correction) and the homogeneity of variances were tested. One-way analysis of variance (ANOVA) was used to compare the groups. When variances were different, Dunnett test was used (global $\alpha=5\%$) and Tukey for equal variances. Control (ischemia and ischemia/reperfusion) and ascorbic groups (ischemia/ascorbic acid and ischemia/reperfusion/ascorbic acid) were compared by Student's t test for independent samples. In all instances, the significance level was set at 5%.

RESULTS

Morphological Changes after Ischemia, Ischemia Reperfusion and Ascorbic Acid Treatment

Figure 2 illustrates the intestinal architecture of the sham, ischemia, ischemia/ reperfusion, and ischemia/reperfusion/ascorbic acid groups.

Intestine wall of the sham group shows the maintenance of the architecture (Figure 2A and 2E). In contrast, intestine specimens of animals with ischemia and ischemia reperfusion show distortion of the architecture by villous necrosis (Figure 2B and 2F) and decrease of villous length (Figure 2C and 2G). This correlates with decrease of villous necrosis and villous length protection, seen in ischemia/reperfusion/ascorbic acid animals group (Figure 2D and 2H). Equally important morphological changes, such as hemorrhagic infarct, are presenting at mesenteric margin in ischemia group and at anti mesenteric margin in ischemia/reperfusion groups (Figure 2I and 2J).

Morphometric Changes after Ischemia, Reperfusion and Ascorbic Acid Treatment

Measurements and graphic illustration of intestinal parameters are presented respectively in Table 1 and Figures 3A-3C. The morphological changes in small intestine (Figure 2) coincided with differences in terms of quantitation in the five groups of animals. In this context, anti mesenteric villous length was significantly shorter in ischemia/reperfusion than in ischemia group (34% vs 45%; $p=0.04$). Equally significant was the high anti mesenteric hemorrhagic infarct amount present in ischemia/reperfusion compared to ischemia group (63% vs 42%; $p=0.01$). Ischemia/reperfusion group also presented higher amount of anti mesenteric hemorrhagic infarct than ischemia/reperfusion/ascorbic acid group (0.63% vs 0.36%; $p=0.009$). Small intestine under ischemia presented significant high values respectively of mesenteric and anti mesenteric villous necrosis when compared to

ischemia/ascorbic acid intestine (0.15% vs 0.04%, $p=0.004$; 0.32% vs 0.19%; $p=0.01$). Crypt and inflammatory cells didn't show statistical differences between groups. Interestingly enough was the significant differences of villous, villous necrosis and hemorrhagic infarct at the mesenteric and anti mesenteric margin (Figure 3A-3B) and the protector effect of ascorbic acid in morphological changes found in ischemia/reperfusion group.

DISCUSSION

High morbidity and mortality are associated with ischemia and reperfusion injury of the intestine in surgical procedures and trauma [2]. Ischemia can easily injure the intestine, and subsequent reperfusion of the intestine increase the damage to the mucosa [12]. Park et al demonstrated that most of the tissue damage produced by the widely employed regional hypotension model occurs at the time of the reperfusion [13]. Similar results were observed in our study where areal fraction of villous and infarct showed significant higher values in ischemia/reperfusion when compared to ischemia group. A large numbers of events, such as oxygen free radical formation, release of iron storage, damage of the microvasculature, inflammatory cytokines, complement activation, and neutrophil infiltration at the site of the injury [14], however, dramatically magnify the lesion. These oxygen radicals generated may also stimulate leukocyte chemotaxis and substances, such as leukotrienes, which once released can increase vascular permeability [15]. These highly reactive and cytotoxic free radicals

cause tissue injury through lipid peroxidation of cell membrane components and degradation of hyaluronic acid collagen [4].

In this context, experimental therapeutics has been tested successfully to attenuate intestinal ischemia/reperfusion injury in animal's models. Potential strategies to overcome ischemia/reperfusion injury include several modalities: ischemic preconditioning [14]; anti complement [16]; anti leukocyte [17]; anti-inflammatory therapies [18,19] with fluorocarbons, glutamine, and glycine supplementation [20]; enteral feeding [21] and antioxidants. Among the antioxidants, allopurinol [22], superoxide-dismutase [23, 24, 25], iron chelator, N-acetyl cysteine, ethanol, tocoferol [26], pentoxifylline, pyruvate[27] and ascorbic acid [9] have been used.

We have demonstrated that in small intestine ischemia/reperfusion injury there is an improvement of hemorrhagic infarct at the anti mesenteric margin after ascorbic acid treatment and to the best of our knowledge, this is the first report of this association using quantitative approaches. Whereas only two prior study with ascorbic acid were able to show a significant relationship between morphological changes and small intestine ischemia/reperfusion [9,28], our results showed that quantitative assessment of histopathologic parameters provides more information than qualitative pathological assessment.

We concluded that ascorbic acid treatment can improve histological indicators of ischemia/reperfusion injury in the rat's small intestine. This raises the possibility to use ascorbic acid in surgery that involves ischemia/reperfusion periods.

New research including a randomized and prospective trial will be important to validate our quantitative assessment, as well as to extend to other oxidants in additional murine models.

REFERENCES

1. Mustafa, A., Ahmet G., Husein, B., and Ibrahim, T. The effects of glucose-insulin-potassium solution and BN 52021 in intestinal ischemia-reperfusion injury. *Vascular & Endovascular. Surgery.* **37**: 345, 2003.
2. Nakao, M., Hirat, Y., Taguchi, T., Yamada, T., Rahman, M. S., and Suita, S. Energy metabolism and xantine oxidase enzyme system during ischemia reperfusion in rat small intestine. *Transplant. Proc.* **28**: 2614, 1996.
3. Collard, C. D., and Simon, G. Pathophysiology, clinical manifestation, and prevention of ischemia –reperfusion injury. *Anesthesiology.* **94**: 1133, 2001.
- 4 Granger, D.N., Hollwarth, M. E., and Parks, D.A. Ischemic-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol. Scand.* 126: 47, 1986.
5. McCord, J. M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Of Med.* 312: 159, 1985

6. Hirata, Y., Taguchi, T., Nakao, M., Yamada, T., Hirose, R., and Suita S. The relationship between the adenine nucleotide metabolism and the conversion of xantine oxidase enzyme system in ischemia-reperfusion of the rat small intestine. *J of Pediatric Surgery* 31: 1199, 1996.
7. Finkeestein, L., Toledo-Pereira, L. H., Castilho, M., and Castellanos, J. Comparative analysis of pharmacological agents following small intestine ischemia. *Transplant Proc.* 1043-4. 1988.
8. Cathcart, R. F. Vitamin C: The nontoxic, nonrate-limited, antioxidant free radical scavenger. *Medical Hypotheses* **18**: 61, 1985.
9. Nakamura, M., Ozaki, M., Fuchinoue, S., Teraoka, S., and Ota, K. Ascorbic acid prevents ischemia-reperfusion injury using antioxidative agents. *Transpl. Int.* **10**: 89, 1997.
10. Quaedackers, J. S. L. T., Beuk, R. J., Bennet, L., Charlton, A., Egbrink M. G. A., Gunn, A. J., and Heineman E. An evaluation of methods for grading Histologic Injury following ischemia/reperfusion of the small bowel. *Transplant. Proc.* **32**: 1307, 2000.
11. Gundersen, H. J. G., Bendtsen, T. F., Korbo, L., Marcussen, N., Moller, A., Nielsen, K., Nyengaard, J. R., Pakkenberg, B., Sorensen, F. B. Vesterby, A., and West, M. J. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS.* **96**: 379, 1988.

12. Kong, S., Blennerhassett, L. R., Hell, K. A., McCauley, R. D., and Hall, J. C. Ischemia-reperfusion injury to the intestine. *Aust. N. Z. J. Surg.* **68**: 554, 1998.
13. Park, D. A. and Granger, D. N. Contribution of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Gastrointestinal and Liver Physiology.* 250: 749, 1986.
14. Mallick, I. H., Yang, W., Winslet, M. C., and Seifalian, A. M. Ischemia-reperfusion injury of the intestine and protective strategies against injury. *Digestive Diseases and Sciences.* **49**:1359, 2004.
15. Nilsson, U. A., Schoenberg, M. H., Aneman, A., Poch, B., Magadum, S., Beger, H. G., and Lundgren O. Free radicals and pathogenesis during ischemia and reperfusion of the cat small intestine. *Gastroenterology.* **106**: 629, 1994.
16. Arumugam, T. V., Shiels, I. A., Woodruff, T. M., Reid, R. C., Fairlie, D. P., and Taylor, S. S. Protective effect of a new C5 receptor antagonist against ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine. *J. Surg. Res.* **103**: 260, 2002.
17. Stojadinovic, A., Smallrige, R., Nath, J., Ding, X., and Shea-Donohue, T. Anti-inflammatory effects of U4359F in arat model of intestinal ischemia/reperfusion injury. *Critical Care Medicine.* **27**: 767, 1999.

18. Takeyoshi, I., Iwanami, K., Ohwada, S., Kawashima, Y., et. Al. Effect of FR167653 on small bowel ischemia-reperfusion injury in dogs. **Digestive Diseases and Sciences. 44:** 2334, 1999.
19. Arumugam, T. V., Shiels, I. A., Margolin, S. B., Taylor, S. M., and Brown, L. Pirfenidone attenuates ischemia-reperfusion injury in the rat small intestine. **CEEPP. 29:** 996 2002.
20. Lee, M. A., Mccauley, R. D., Kong, S., and Hall, J. C. Pretreatment with glycine reduces the severity of warm intestinal ischemic-reperfusion injury in the rat. **Ann. Plastic Surg. 46:** 320, 2001.
21. Salehi, P., Madsen, K., Zhu, J., Castilho, E., Ávila, J., Lakey, J. R. T., and Churchill, T. A. Alleviating ischemia-reperfusion injury in small bowel. **Am. J. Transplant. 4:** 728, 2004.
22. Feza, M. A., Mustafa, O., Orhan, Y., Murat, G., Tanju, A., Mustafa, Y., and Gonca A. The effect of allopurinol pretreatment on intestinal hypoperfusion encountered after correction of intestinal volvulus. **J. Ped. Surg. 31:** 1205, 1996.
23. Bilbao, J., Garcia-Alonso, L., Portugal, V., Barceló, P., Ortiz, J., and Méndez, J. Utilidad terapêutica de fármacos antioxidantes em el síndrome de reperfusion intestinal experimental. **Re. Esp. Enf. Digest. 80:** 237, 1991.

24. Deshnukh, D. R., Mirochnitchenko, O., Ghole, V. S., Agnese D., Shah, P. C., Redell, M., Brolin R. E., and Inouye, M. Intestinal ischemia and reperfusion injury in transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **273**: 1130, 1997.
25. Osborne, D. L., Aw, T. Y., Cepinskas, G., Kvietys, P. R., and Patsy, R. Development of ischemia/reperfusion tolerance in the rat small intestine: An epithelium-independent event. *J. Clin. Invest.* **94**: 1910, 1994.
26. Yoshida, W. B., Alasio, T., Mazziota, R., Qin, F., Kashani, M., Lee, S., and Dardik, H. Effect of (**alfa**) tocoferol, taurine and selenium on attenuation of ischemia-reperfusion injury of splanchnic organs. *Cardiovasc. Surg.* **6**: 178, 1998.
27. Cicalese, L., Rastellini, C., Rao, A. S., and Stanko, R. T. Pyruvate prevents mucosal reperfusion injury, oxygen free-radical production, and neutrophil infiltration after small bowel preservation and transplantation. *Transplant Proc.* **28**: 2611, 1996.
28. Grunel, E., Caglayan, F., Caglayan O., Dilsiz, A, Duman, S. Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. *J. Pediatr. Surg.* **33**:10, 1998.

FIGURES AND LEGENDS FOR FIGURES

Figure 1. Eyepiece sampling grid superimposed on small intestine.

Figures 2 (A to J). Panoramic view of the intestinal architecture of the sham, ischemia, ischemia/ reperfusion and ischemia/reperfusion/ascorbic acid groups is shown in panel A to D. Detail of the intestinal architecture of the sham, ischemic, ischemic/ reperfusion and ischemic/reperfusion/ascorbic acid groups. Note the maintenance of the architecture of intestine wall in sham group (E). Distortion of the architecture by villous necrosis (F) and decrease of villous length (G) in intestine specimens of animals with ischemia and ischemia reperfusion. In contrast, ischemia/reperfusion/ascorbic acid treated animals (H) show decrease of villous necrosis and maintenance of villous cell length. Morphological changes visualized in ischemic and ischemic reperfusion intestines: hemorrhagic infarct is presenting at mesenteric margin in ischemia group (I) and at anti mesenteric margin in ischemia/reperfusion group (J).

H&E stain (A, X100; B,C,D,I,J X40). H&E stain (E,F,G, X 400; H, X100).

S=sham; I=ischemia; IR=ischemia/reperfusion

IA=ischemia/ascorbic acid; IRA=ischemia/reperfusion/ascorbic acid

anti mesenteric I vs anti mesenteric IR ($p=0.04$) t test

S=sham; I=ischemia; IR=ischemia/reperfusion

IA=ischemia/ascorbic acid; IRA=ischemia/reperfusion/ascorbic acid

mesenteric I vs mesenteric IA ($p=0.004$) t test

anti mesenteric I vs anti mesenteric IA ($p=0.01$) t test

Figure 3 (A to C). Fractional area of mesenteric and anti mesenteric villous (A) villous necrosis (B) and hemorrhagic infarct (C) according to the sham, ischemia, ischemia/reperfusion, ischemia/ascorbic acid and ischemia/reperfusion/ascorbic acid groups.

TABLES

Table 1. Summary of measured intestinal parameters (mean and range) and comparison of the groups after Anova or Independent-Samples T Test

		GROUPS					<i>p Value</i>
		Sham	Ischemia	Ischemia/ Reperfusion	Ischemia/ ascorbic Acid	Ischemia/ Reperfusion/ ascorbic Acid	
Parameters		Areal Fraction in Per Cent					
Villous	M	.93 (.82-1.0)	.57 (.39-.76)	.53 (.40-.88)	.62 (.43-.75)	.60 (.39-.94)	0.47***
	AM	.90 (.85-.95)	.45 (.16-.72)*	.34 (.17-.66)*	.48 (.31-.76)	.40 (.22-.81)	0.04
Crypt	M	.97 (.80-1.2)	.82 (.57-1.1)	.94 (.80-1.2)	.93 (.79-1.2)	.92 (.70-1.2)	0.19***
	AM	.97 (.79-1.1)	.84 (.59-1.3)	.96 (.63-1.2)	.80 (.62-.94)	.85 (.70-1.2)	0.06
Villous	M	.0(.0-.0)	.15 (.03-.34)*	.13 (.0-0.3)	.04 (.0-.11)*	.08 (.0-0.3)	0.004
Necrosis	AM	.0 (.0-.0)	.32 (.25-.38)*	.32 (.12-.48)	.19 (.07-.38)*	.24 (.04-.37)	0.01
Hemorrhagic	M	.0 (.0-.0)	.18 (.0-.45)	.25 (.0-.65)	.15 (.0-.35)	.20 (.02-.56)	0.5
Infarct	AM	.0 (.0-.0)	.42**(.22-.76)	.63 (.36-1.2)*	.48 (.19-.99)	.36 (.09-.95)*	0.009
Inflammatory	M	23 (17-46)	29 (20-36)	27 (22.6 – 37)	29 (17-32)	30 (20-41)	0.05
Cells	AM	24 (18-30)	28 (20-35)	29 (22-46)	28 (14- 46)	30 (20-43)	0.2

Abbreviations: M, mesenteric; AM, anti mesenteric.

* difference between two groups (Student t test)

** difference between ischemia X ischemia/reperfusion groups (p=0.01) (Student t test)

***difference among groups (Anova)