Wilson Kohama Chimabucuro

**Isquemia mesentérica e reposição do volume
intravascular**

*Estudo comparativo entre duas soluções salinas com
diferentes concentrações de cloreto de sódio nos eventos
desencadeados pela reperusão intestinal
Um modelo experimental em ratos*

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

Área de Concentração: Emergências Clínicas

Orientador: Prof. Dr. Francisco Garcia Soriano

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Chimabucuro, Wilson Kohama

Isquemia mesentérica e reposição do volume intravascular : estudo comparativo entre duas soluções salinas com diferentes concentrações de cloreto de sódio nos eventos desencadeados pela reperfusão intestinal : um modelo experimental em ratos / Wilson Kohama Chimabucuro. -- São Paulo, 2009.

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

Área de concentração: Emergências Clínicas.

Orientador: Francisco Garcia Soriano.

Descritores: 1.Isquemia 2.Intestino delgado 3.Modelos animais de doenças
4.Solução salina hipertônica 5.Estresse oxidativo 6.Síndrome de resposta inflamatória
7.Malondialdeído 8.Mieloperoxidase 9.Interleucinas 10.Choque

Ao Amigo

Adoniram de Mauro Figueiredo

Agradecimentos

Agradeço a todos que me ajudaram e me apoiaram na confecção desta tese,

ao meu orientador Professor Dr. Francisco Garcia Soriano,

ao Dr. Bomfim Alves da Silva Junior,

aos amigos do LIM-51: Fátima, Márcia, Ana, Kely, Suely, Hermes...

Muito obrigado.

Wilson Kohama Chimabucuro

Sumário

Página de Rosto

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

Resumo

Summary

Introdução..... 1

Materiais e Métodos..... 16

Resultados..... 28

Discussão..... 50

Referências..... 70

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

AMS: Artéria Mesentérica Superior

cm: centímetros

ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay

et al: e outros

h, hs: hora, horas

IF : Isquemia Falsa. Grupo de animais submetidos à laparotomia sem isquemia mesentérica

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

im: Intramuscular

ip: Intraperitoneal

iv: Intravenoso

kg: quilograma

MDA: Malondialdeído

ml: mililitro

mm: milímetros

mmHg: milímetros de mercúrio

NF-κB: Nuclear Factor kappa-B

MPO: Mieloperoxidase

NO: Óxido Nítrico

NOS: Óxido Nítrico Sintetase

PAM: Pressão Arterial Média

pg: Picograma

SF: Grupo de animais submetidos à isquemia e tratados com soro fisiológico

SF 0,9%: Solução Salina Fisiológica ou Soro Fisiológico ou Solução de Cloreto de Sódio a 0,9 gramas por 100 mililitros de solução

SH: Grupo de animais submetidos à isquemia e tratados com Solução Hipertônica.

SH 7,5%: Solução de Cloreto de Sódio a 7,5 gramas por 100 mililitros de solução ou Solução Salina Hipertônica ou Solução Hipertônica

ST: Grupo de animais submetidos à isquemia mesentérica e não receberam tratamento.

TNF α : Fator de Necrose tumoral Alfa

vs: versus

° C: graus Celsius

®: Marca Registrada

μ g: micrograma

μ mol: micromol

μ l: microlitros

ρ : (Rô) – Correlação de Sperman

Resumo

Chimabucuro WK. Isquemia mesentérica e reposição do volume intravascular. Estudo comparativo entre duas soluções salinas com diferentes concentrações de cloreto de sódio nos eventos desencadeados pela reperfusão intestinal. Um modelo experimental em ratos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 84p.

A isquemia do intestino delgado ocorre nas oclusões arteriais dos vasos mesentéricos ou associada à baixa perfusão tecidual causada por choque circulatório. Seus efeitos deletérios locais e sistêmicos frequentemente agravam a evolução clínica de muitas doenças. Este estudo experimental investiga como a reposição do volume intravascular utilizando duas soluções salinas com diferentes concentrações de sódio (solução salina fisiológica e solução 7,5% de cloreto de sódio) modifica a resposta inflamatória e o estresse oxidativo causados pela isquemia do intestino delgado.

Ratos Wistar, machos, peso corporal entre 250 e 300 g, número total =102, foram submetidos à oclusão transitória da artéria mesentérica superior durante 45 minutos. No protocolo utilizado, os animais foram sorteados para inclusão em um de quatro grupos experimentais: isquemia falsa (IF), isquemia intestinal seguida da infusão de solução salina hipertônica 7.5% em volume de 4 ml/kg de peso (SH), isquemia intestinal seguida da infusão de solução salina 0.9% em volume de 33 ml/kg de peso (SF) e isquemia intestinal sem reposição do volume intravascular (ST). Quando apropriado, as soluções foram administradas lentamente (5 minutos) pela veia jugular externa imediatamente antes da reperfusão intestinal. Em cada grupo experimental, logo após a reperfusão intestinal, os animais foram sorteados para tempo de sobrevivência: 2 horas, 4 horas ou 6 horas após a reperfusão. Amostras de sangue foram colhidas pela veia jugular externa em vários períodos: imediatamente após a liberação da oclusão da artéria mesentérica, 2 horas, 4 horas e 6 horas após a reperfusão intestinal. O plasma foi separado e foram realizadas as dosagens de interleucinas (IL-6 e IL-10). No tempo determinado, os animais foram submetidos à

eutanásia em condições humanamente aceitáveis e, então, nesse momento, foram colhidas amostras de tecidos (intestino, fígado e pulmão) para posterior quantificação das concentrações de malondialdeído (MDA) e interleucinas (IL-6 e IL-10). A atividade da mieloperoxidase (MPO) também foi avaliada nessas amostras.

Os animais que não receberam tratamento apresentaram uma taxa de mortalidade maior do que os demais grupos. Os grupos de animais tratados com reposição de volume intravascular apresentaram uma taxa de mortalidade semelhante ao grupo de isquemia falsa. Os animais que receberam reposição de volume intravascular com soluções cristalóides (SH ou SF) apresentaram concentrações de MDA, MPO, IL-6 e IL-10 nos tecidos (intestino, fígado e pulmão) comparáveis ao grupo de animais com isquemia falsa. Em todos os momentos, esses valores foram mais elevados no grupo que não recebeu tratamento. As concentrações plasmáticas da IL-6 e da IL-10 foram mais elevadas nos animais tratados com SH.

As análises mostram que a simples abertura da cavidade abdominal causa um trauma cirúrgico relevante aos animais e é responsável pelas alterações observadas no grupo de isquemia falsa. Os resultados sugerem que a isquemia intestinal transitória (45 minutos) realizada por oclusão da artéria mesentérica superior em ratos representa um modelo experimental de moderada gravidade. Dessa maneira, o modelo é adequado aos estudos das alterações bioquímicas e celulares que ocorrem a curto, médio e longo tempo de sobrevivência. Este estudo foi elaborado para análise dos fatores relativos ao estresse oxidativo e reação inflamatória que ocorrem nas primeiras horas que seguem a reperusão intestinal. De uma maneira geral, os animais foram beneficiados pela reposição do volume intravascular com soluções cristalóides. A solução salina fisiológica foi utilizada em volume aproximadamente oito vezes superior à solução hipertônica 7,5% de cloreto de sódio. Comparativamente, a atenuação similar das respostas deletérias após a reperusão intestinal atingida com o uso de menor volume da solução hipertônica 7,5% de cloreto de sódio representa um fator positivo para a mesma. Considera-se que a maior concentração plasmática das interleucinas (IL-6 e IL-10) encontrada nos animais tratados com solução hipertônica 7,5% de cloreto de sódio esteja relacionada ao aumento de permeabilidade da microcirculação associado às soluções hipertônicas.

Descritores: 1. Isquemia, 2. Intestino delgado, 3. Modelos animais de Doenças, 4. Solução Salina Hipertônica, 5. Estresse oxidativo, 6. Resposta Inflamatória Sistêmica, 7. Malondialdeído, 8. Mieloperoxidase, 9. Interleucinas, 10. Choque.

Summary

Chimabucuro WK. Intestinal ischemia and intravascular fluid reposition. How two saline solutions containing different sodium chloride concentration could modify the deleterious responses triggered by intestinal reperfusion. An experimental model in rat [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 84pp.

Gut ischemia is responsible for both local and systemic deleterious events. Since reperfusion occurs in a previous ischemic superior mesenteric artery territory (SMA), a succession of harmful mechanisms begins in the luminal epithelium that quickly lengthens the limits of the intestinal tract. Depending on the extension of the intestinal system involved in the ischemic/reperfusion injury there will be severe repercussion to distant organs in response to SMA occlusion. Several diseases could be associated with variables degrees of intestinal ischemia. Even minor intensity of intestinal ischemia had deleterious systemic effects and often aggravates the clinical outcome of many diseases. Our study investigates how different forms of volume restoration could modify two important mechanisms of injury after intestinal ischemia: oxidative stress and inflammatory responses.

Wistar rats (n=102) were submitted to transient superior mesenteric artery occlusion (SMAo). After randomization, animals were divided in four groups: Sham intestinal ischemia; infusion of small volume of 7.5% hypertonic saline (HS), or infusion of high volume of 0.9% saline (NS) just prior reperfusion, and animals that did not receive intra vascular volume treatment (NT). At sequential times, the animals were euthanatized and tissue samples (lung, liver, and intestine) were collected to Malondialdehyde (MDA) dosage and myeloperoxidase (MPO) activity. Also, sequential plasmatic concentration of IL-6 and IL-10 were done.

Animals treated with both forms of volume infusion showed lower levels of tissue MDA, MPO, IL-6, and IL-10 than found in NT group. Plasmatic concentration of IL-6 and IL-10 were higher in animals treated with HS. Positive correlation was found between tissue concentration of IL-10 and IL-6.

The mortality rate was similar between the treated rats and the group of sham ischemia. The mortality rate was higher in the non treated animals. In this rat model of transient intestinal ischemia, adequate maintenance of intravascular volemia decreases oxidative stress and synthesis of inflammatory markers. Small volume of 7.5% HS (4ml/Kg body weight) and high amounts of NS ($\approx$ 33 ml/Kg body weight) had similar effects in attenuation of these responses. In this study, 7.5% HS attenuates deleterious effects found after intestinal ischemia with the main advantage of the smallest volume utilized when compared with NS solution.

Plasmatic concentrations of IL-6 and IL-10 were higher in HS treated animals. This observation is supported by action of hypertonic/hyperosmotic solutions at the microcirculatory level. These solutions increase the local vascular permeability. This characteristic of 7.5% HS solution could facilitate the passage of the locally produced interleukin to the systemic circulation.

Keywords: 1. Ischemia, 2. Intestine, 3. Disease animals models, 4. Hypertonic Saline Solution, 5. Oxidative Stress, 6. Systemic Inflammatory Response Syndrome, 7. Malondialdehyde, 8. Myeloperoxidase, 9. Interleukins, 10. Shock

Introdução

O aparelho digestório representa um dos sistemas mais extensos do organismo e possui características muito particulares. É formado por um sistema tubular que começa e termina em orifícios abertos ao meio externo ao qual estão agregados órgãos responsáveis pela produção de enzimas responsáveis pela digestão dos alimentos (SIMEONE, 2006). O sistema tubular segue um longo trajeto pelo corpo com componentes na região cefálica, torácica e abdominal (RAYBOULD *et al*, 2003). Em todo o seu caminho, preserva o meio interno através de especializações sofisticadas da sua parede que permitem o transporte dos alimentos ao longo do sistema e, também, a secreção de substâncias relacionadas à sua digestão (BAUMGART & DIGNASS, 2002). Cerca de 90% desse sistema tubular é formado pelo trato gastrointestinal.

As etapas mais importantes da digestão dos alimentos e todos os mecanismos relacionados à absorção de nutrientes ocorrem no trato gastrointestinal (GUYTON & HALL, 2002). Além de ser o responsável pela digestão dos alimentos e absorção de nutrientes essenciais ao organismo, o trato gastrointestinal impõe uma barreira à entrada de substâncias deletérias presentes na luz tubular, (meio externo) (BAUMGART & DIGNASS, 2002). Os mecanismos relacionados ao transporte/digestão dos alimentos e à absorção ou retenção de substâncias na luz intestinal têm uma alta taxa metabólica (CONG *et al*, 2000). As variações no consumo de energia pelo trato gastrointestinal seguem vários estágios relacionados

às fases dos processos digestivos e são acompanhadas de alterações equivalentes no fluxo sanguíneo arterial (HAGLUND, 1994).

A irrigação do trato intestinal ocorre através de troncos arteriais principais (artéria mesentérica superior e artéria mesentérica inferior) e colaterais com o tronco celíaco (SCHNEIDER *et al*, 1994; ROSENBLUM *et al*, 1997). Obstruções crônicas das artérias principais podem ser parcialmente compensadas pelo aumento do fluxo sanguíneo pelo sistema colateral. Entretanto, obstruções agudas da irrigação do intestino ou a presença de doenças que diminuem globalmente a perfusão sistêmica (choque circulatório) são responsáveis por graves alterações isquêmicas no trato intestinal (JAKOB, 2002; CERQUEIRA *et al*, 2005).

Alterações isquêmicas do intestino ocorrem na prática clínica em inúmeras situações. De um modo geral, a isquemia intestinal pode ocorrer após interrupção da sua circulação arterial (como na embolia ou trombose arterial) ou por diminuição do fluxo sanguíneo arterial sistêmico (como nos diferentes estados de choque circulatório) (CERQUEIRA *et al*, 2005; YASUHARA, 2005). O grau de comprometimento da perfusão intestinal depende da localização da obstrução arterial (obstrução no tronco das artérias principais ou distal em um de seus ramos arteriais), da presença de circulação colateral e da intensidade de diminuição do débito cardíaco.

A artéria mesentérica superior é responsável pela irrigação de todo intestino delgado (ROSENBLUM *et al*, 1997; SIMEONE, 2006). Somente nas suas porções proximal e distal (duodeno e íleo), pode ocorrer algum grau de circulação colateral com outros troncos arteriais (proximal com ramos do tronco celíaco e distal com

ramos da artéria mesentérica inferior). A obstrução do fluxo na artéria mesentérica superior representa aproximadamente 2 % entre todas as doenças do sistema gastrointestinal (YASUHARA, 2005). O diagnóstico de isquemia da artéria mesentérica superior é dificultado pelo quadro clínico de apresentação variável e, muitas vezes, a isquemia intestinal é percebida tardiamente. Isso parece estar relacionado aos altos índices de morbidade e mortalidade da isquemia intestinal na prática médica.

Estima-se que nos Estados Unidos da América, uma a cada mil internações hospitalares seja devida à isquemia intestinal e que o óbito ocorra em uma faixa entre 59 a 93 % desses casos (BRANDT & BOLEY, 2000; HIRSCH, *et al*, 2006). A isquemia do intestino é mais frequente após a quinta década de vida e não tem distribuição preferencial por raça ou sexo (BRANDT & BOLEY, 2000). Alguns estudos sugerem que o aumento da expectativa de vida da população deverá ser acompanhado de uma incidência maior de isquemia mesentérica na prática clínica (BRANDT & BOLEY, 2000).

Como foi dito anteriormente, a apresentação clínica da isquemia mesentérica é bastante variável. A evolução dos sintomas relacionados à isquemia intestinal é determinada pela forma de comprometimento da circulação mesentérica. Nos casos de embolia na artéria mesentérica superior, por exemplo, o quadro inicia-se com dor abdominal de instalação súbita, difusa e de forte intensidade (KOUGIAS *et al*, 2007). Caracteristicamente, a dor é referida pelo paciente com uma intensidade muito maior do que a dor percebida pelo médico ao exame do abdome (HIRSCH *et al*, 2006). A presença de vômitos, e os sinais de distensão abdominal decorrente da atonia do intestino seguem, rapidamente, a queixa inicial da dor isquêmica do intestino.

Por outro lado, nos casos de trombose da artéria mesentérica superior a instalação do quadro de dor abdominal pode ser insidiosa e incaracterística (KOUGIAS *et al*, 2007). Na fase inicial da trombose mesentérica, a dor abdominal pode ser intermitente e relacionada à ingestão de alimentos. Os sinais de atonia intestinal que seguem a isquemia mesentérica podem, da mesma forma, apresentar uma evolução lenta no seu aparecimento (LOCK, 2001). Nos casos de isquemia mesentérica provocado pelo estado de choque circulatório, muitas vezes, não há dor abdominal e sim atonia intestinal indicando presença de isquemia do intestino (LOCK, 2001). A obstrução intestinal por neoplasias ou por aderências entre as vísceras, processos inflamatórios intra-abdominais, hérnias internas com torção de alças intestinais (“volvos”) e trombose das veias mesentéricas, também, estão associados aos quadros de isquemia intestinal (YASUHARA, 2005).

Na isquemia mesentérica, os exames laboratoriais contribuem pouco para o diagnóstico. As alterações laboratoriais são inespecíficas como, por exemplo, leucocitose (cerca de 50% dos casos) com identificação de formas jovens dos neutrófilos (bastonetes, metamielocitos, mielócitos) na circulação periférica e a gasometria arterial mostrando acidose láctica (HIRSCH *et al*, 2006). Até o momento, não foram descritos marcadores séricos que pudessem, com mais precisão e sensibilidade, fazer o diagnóstico de isquemia mesentérica. As radiografias simples do abdome mostram alterações que não são específicas de isquemia intestinal, tais como, sinais de atonia e edema de alças intestinais (BRANDT & BOLEY, 2000). Devemos ressaltar que a melhor qualidade das radiografias digitais facilita a identificação das alterações descritas acima e, também, favorecem a visualização de sinais sugestivos de necrose da parede intestinal como a pneumatose (presença de ar

na parede das alças intestinais) (MAATAOUI *et al*, 2008; MEYER-LINDENBERG *et al*, 2008). A tomografia computadorizada do abdome pode auxiliar no diagnóstico diferencial da isquemia mesentérica e ajuda a afastar outras causas de atonia intestinal, do edema de alças intestinais e da pneumatose intestinal (BRANDT & BOLEY, 2000).

Em casos selecionados, a arteriografia das artérias mesentéricas pode confirmar o diagnóstico de isquemia intestinal (BRANDT & BOLEY, 2000). Quando a arteriografia seletiva é realizada no pré-operatório, a infusão intra-arterial de agentes trombolíticos e drogas vasodilatadoras está associada à melhora do prognóstico do paciente após a intervenção cirúrgica (HIRSCH *et al*, 2006). Lembramos, entretanto, que resultados falso-negativos na análise desse exame não são incomuns na prática clínica (WYERS *et al*, 2007).

Os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da lesão isquêmica dos intestinos são dependentes do tipo de isquemia (permanente ou transitória), da intensidade (total ou redução do fluxo sanguíneo regional), da duração da isquemia transitória, da causa da isquemia e da terapêutica utilizada (KHANNA *et al*, 2001). Isquemia total e permanente do intestino leva, invariavelmente, à necrose da alça intestinal. Por outro lado, a isquemia intestinal transitória (seguida de reperfusão) ou a isquemia incompleta do intestino (diminuição da perfusão) acompanham-se de inúmeras alterações no metabolismo celular cuja somatória determina a viabilidade ou a morte da célula.

A circulação mesentérica recebe cerca de 30% do débito cardíaco (ACKLAND *et al*, 2000; OLDENBURG *et al*, 2004). Isso acontece devido à grande

extensão de território a ser irrigado e à alta taxa de metabolismo do trato gastrointestinal. Episódios de isquemia seguidos de reperfusão e estados mantidos de perfusão tecidual diminuída causam intensas alterações no metabolismo celular (HAGLUND, 1994; CERQUEIRA *et al*, 2005; SASAKI & JOH, 2007). A lesão irreversível da célula depende do tempo de duração do bloqueio/diminuição da perfusão tecidual. Períodos de isquemia prolongada levam à morte celular (CARDEN & GRANGER, 2000).

A morte celular após a isquemia é desencadeada por mecanismos que são ativados em períodos de tempo variáveis para cada tipo de célula. Diferentes tipos de células apresentam graus variáveis de resistência à isquemia (CARDEN & GRANGER, 2000; LI & JACKSON, 2002). Caracteristicamente, os neurônios são extremamente sensíveis à isquemia em contraponto com as células musculares esqueléticas que são bastante resistentes a ela (WHITE *et al*, 2000). Assim, o restabelecimento da perfusão sanguínea adequada em tempo hábil pode levar à preservação das células e, portanto, à recuperação funcional do órgão comprometido. Contudo, lembramos que mesmo períodos curtos de isquemia tecidual são responsáveis por inúmeras alterações no metabolismo celular que se iniciam após o restabelecimento do fluxo sanguíneo arterial (SCHOENBERG & BEGER, 1993).

A produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) é o principal mecanismo na fisiopatologia das lesões teciduais causadas pela reperfusão de um órgão previamente isquêmico (LAMMERS *et al*, 2003). Em situações específicas, o estresse oxidativo pode assumir grandes proporções e desencadear alterações no meio interno que ultrapassam os limites da região previamente acometida (LAMMERS *et al*, 2003; CERQUEIRA *et al*, 2005). É o que

parece acontecer após um período de isquemia transitória do intestino. Devido à sua grande extensão, o trato intestinal após ser submetido à isquemia e reperfusão intestinal, produz uma grande quantidade de espécies reativas de oxigênio que atingem um nível suficiente para promover alterações sistêmicas.

Este aumento na produção de espécies reativas de oxigênio leva a um esgotamento do seu sistema de neutralização. As espécies reativas de oxigênio por terem um único elétron na camada externa do átomo de oxigênio são moléculas altamente reativas. Essas moléculas, principalmente o radical hidroxila, reagem com a camada lipídica das membranas (peroxidação lipídica) e promovem lesão da membrana celular e de organelas. A lesão dessas membranas faz com que haja alteração da resposta celular, podendo desencadear mecanismos que iniciam necrose ou apoptose da célula (CERQUEIRA *et al*, 2005). No intestino, a lesão celular é fator para perda de barreira mucosa e consequente translocação bacteriana (NIEUWENHUIJZEN & GORIS, 1999; BAUMGART & DIGNASS, 2002).

Ao mesmo tempo, o estresse oxidativo causa alterações nos mecanismos de resposta celular que comprometem a transcrição de fatores celulares e modificam o metabolismo celular (NORDBERG, 2001). Entre as inúmeras consequências possíveis, de maneira relevante, essas alterações podem liberar as vias responsáveis pela produção de substâncias relacionadas aos processos inflamatórios e aos mecanismos de morte celular (SCHOENBERG & BEGER, 1993). Em particular, substâncias envolvidas nas reações inflamatórias após a reperfusão intestinal podem atingir a circulação sistêmica e, dessa maneira, comprometer órgãos distantes da cavidade abdominal.

Após a reperfusão, ou durante uma diminuição prolongada do fluxo sanguíneo mesentérico, são ativados sinalizadores intracitoplasmáticos (por exemplo, NF- kappa B) que migrando até o núcleo da célula levam à ativação de genes relacionados à expressão de polipeptídeos pró-inflamatórios e de enzimas relacionadas à síntese de moléculas inflamatórias (KOIKE *et al*, 2000). São exemplos desses polipeptídios e dessas enzimas: óxido nítrico sintetase induzida (óxido nítrico – NO), cicloxigenase tipo II (cascata do ácido araquidônico), fosfolipase A₂, interleucinas (citoquinas e quimoquinas) e o marcador da membrana celular CD4 (*cluster of differentiation 4*) (BOWLES *et al*, 2000; PANÉS & PIQUÉ, 2003).

O processo inflamatório é iniciado localmente pela produção de moléculas de adesão pelo endotélio da região envolvida (*selectina P* e *selectina E*) (WEIGAND, 2004). Em condições basais os neutrófilos trafegam na região mais central da corrente sanguínea (figura 1), porém sob ação das *selectinas* endoteliais, essas células aproximam-se da parede do vaso (figura 2). Após um estímulo apropriado, o neutrófilo passa a expressar moléculas (*selectina L*) na sua membrana celular e, atraídos pelas *selectinas* endoteliais juntamente com as moléculas de adesão do endotélio (*cellular adhesion molecule* - CAM) apresentam um processo conhecido como “rolamento” aonde o neutrófilo deixa de seguir o fluxo sanguíneo e entra em íntimo contato com as células endoteliais, rolando sobre elas (figura 3). Finalmente, a forte atração exercida pelas moléculas de adesão endoteliais da família das integrinas leva à fixação do neutrófilo ao endotélio, o que permitirá a sua diapedese para o interstício (figura 4).

Figura 1- Representação esquemática da microcirculação em uma situação normal (canto superior esquerdo) e na fase inicial da inflamação (canto inferior direito). Notar a expressão de selectinas P e E pelas células endoteliais no local da inflamação. Os leucócitos mantêm em sua membrana celular a selectina L na forma inativa. Na situação normal, os leucócitos mantêm-se na região central dos vasos sanguíneos. A escala “informal” serve como controle para comparação com as figuras 2, 3 e 4.

Figura 2- No início da reação inflamatória, as selectinas L presentes nos leucócitos tornam-se “ativas” e, então, são atraídas para a periferia do vaso sanguíneo (setas), aproximando-se das células endoteliais

Figura 3 Com a evolução do processo inflamatório, as células endoteliais expressam em sua membrana luminal moléculas de adesão que são responsáveis pela forte atração dos leucócitos contra a parede dos vasos sanguíneos. Os leucócitos passam a sofrer um processo de "rolamento" sobre a parede do vaso.

Figura 4 A forte aproximação do leucócito á parede do vaso, propicia a migração do leucócito para o órgão. No interstício, os leucócitos passam a produzir interleucinas em grande quantidade e variedade. Esses polipeptídeos são responsáveis pela modificação (amplificação ou atenuação) das respostas inflamatórias locais.

A célula endotelial produz enzimas que estão envolvidas no início e na manutenção do processo inflamatório (TERADA, 2002; SOUZA *et al*, 2003). A óxido nítrico sintetase (NOS) induzida é produzida por inúmeras células envolvidas na inflamação e, caracteristicamente, é responsável pela síntese de óxido nítrico em grandes quantidades. Nessa situação, além do conhecido efeito de vasodilatação pré-capilar, o óxido nítrico encontra-se em concentrações suficientes para reagir com moléculas de superóxido e transformar-se em uma potente espécie reativa de oxigênio, o peroxinitrito. Diferente das outras espécies reativas de oxigênio, o peroxinitrito persiste ativo na célula por um período de tempo maior. Por esse motivo, é passível de atingir o núcleo da célula e causar alterações no DNA celular (SCHOENBERG & BEGER, 1993; BEDARD & KRAUSE, 2007).

Outro exemplo de enzima produzida durante a reação inflamatória é a ciclo-oxigenase tipo 2. Assim como a óxido nítrico sintetase induzida mantém grande homologia com as óxido nítrico sintetases presentes normalmente nas células (óxido nítrico sintetase endotelial e a óxido nítrico sintetase neuronal), a ciclo-oxigenase tipo 2 mantém grande homologia com a ciclo-oxigenase tipo 1. A ciclo-oxigenase tipo 1 existe naturalmente nas células e está relacionada ao metabolismo do ácido araquidônico, levando à produção de tromboxanos e leucotrienos (BOROS *et al*, 1991; THOMAS *et al*, 2002a). Essas moléculas tem ação fisiológica nos vasos sanguíneos e estão relacionadas aos mecanismos de coagulação (HATOUM & BINION, 2005). A ciclo-oxigenase tipo 2 produzida durante a inflamação é responsável pela síntese de leucotrienos e tromboxanos em altas concentrações o que leva ao comprometimento da circulação na região afetada (ATTUWAYBI *et al*, 2004b).

A infiltração de células inflamatórias no interstício leva à produção de polipeptídeos que mantêm e amplificam a resposta inflamatória (interleucinas) (NEZU *et al*, 2008). As interleucinas pertencem a dois grupos: as quimoquinas e as citoquinas. Essas substâncias representam secreções parácrinas das células inflamatórias e tem a função de quimiotaxia para os leucócitos (quimoquinas) e modulação da resposta inflamatória (citoquinas). De uma maneira geral, as citoquinas podem apresentar uma ação preponderantemente pró-inflamatória ou anti-inflamatória.

Uma vez iniciada a reação inflamatória, sequencialmente, surgem eventos que tendem a limitar os processos inflamatórios em curso e direcionam mecanismos para resolução desse quadro. Assim, em um determinado momento, a presença das citoquinas pode ajudar na identificação da fase evolutiva do processo inflamatório. São consideradas citoquinas pró-inflamatórias o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina tipo 1 (IL-1), interleucina tipo 6 (IL-6) (GROTZ *et al*, 1999). Exemplos de citoquinas anti-inflamatórias são a interleucina tipo 8 (IL-8) e a interleucina tipo 10 (IL-10). Como vimos anteriormente, as interleucinas são secreções parácrinas das células inflamatórias e, por definição, agem na região comprometida. Entretanto, a produção aumentada desses peptídeos pode levá-los a atingir a circulação periférica e, nesses casos, a sua concentração sérica poderia ser indicativa da magnitude do processo inflamatório (GROTZ *et al*, 1995).

A isquemia intestinal seguida de reperfusão ou a manutenção de um estado de diminuição da perfusão sanguínea no intestino estão relacionadas a múltiplos fatores potencialmente lesivos ao organismo e, muitas vezes, podem desencadear reações sistêmicas que levam à morte. Sob qualquer perspectiva, o restabelecimento rápido e

completo da circulação sanguínea ao intestino é o principal fator relacionado ao controle dos mecanismos de lesão em curso. Portanto, o restabelecimento dos parâmetros fisiológicos, tais como volume intravascular e débito cardíaco, apresentam-se como um objetivo inicial a ser atingido (BAGSHAWA & BELLOMO, 2007).

O trabalho de VELASCO e colaboradores em 1980 trouxe à discussão o uso de soluções hiperosmolares de cloreto de sódio para restabelecimento do volume intravascular em situações de choque hemorrágico. Esses autores mostraram que o uso de volumes pequenos de soluções salinas em concentrações de 7.5% reduziam a mortalidade em cães submetidos a choque hemorrágico controlado. Essas soluções hiperosmolares tem características de hipertonidade e passaram a ser chamadas de soluções hipertônicas de cloreto de sódio 7,5% (SH 7,5%). Inúmeros estudos demonstraram a eficiência da SH 7,5% administrada em volumes pequenos no rápido restabelecimento da volemia e do débito cardíaco em modelos experimentais de choque hemorrágico (JONAS *et al*, 2000; KOLSEN-PETERSEN, 2004; GONZALEZ *et al*, 2005; ROCHA-E-SILVA & FIGUEIREDO, 2005).

As soluções hipertônicas de cloreto de sódio 7,5% tem sido estudadas em diversos modelos experimentais de choque circulatório (ZAKARIA & GARRISON, 2006). Além do seu conhecido efeito para tratamento do choque hemorrágico, o laboratório experimental mostrou que a SH 7,5% apresenta efeitos favoráveis também em modelos de choque séptico e endotóxico (ASSALIA *et al*, 2001). O efeito anti-inflamatório da SH 7,5% foi extensamente demonstrado em estudos experimentais tanto *in vitro* como *in vivo* (GUSHCHIN *et al*, 2002; ATTUWAYBI *et al*, 2004a; KOLSEN-PETERSEN, 2004). Os mecanismos envolvidos na ação anti-

inflamatória da SH 7,5% não são conhecidos, entretanto, parecem envolver alterações na marginalização e aderência dos neutrófilos na microcirculação e mudanças nas respostas das células inflamatórias.

O restabelecimento do volume intravascular com a utilização de solução salina (cloreto de sódio 0,9%) deve ser realizado com a infusão de grandes quantidades da solução (DROBIN & HAHN, 2002). De uma maneira geral, no choque hemorrágico, calcula-se o volume inicial de solução salina a ser infundido como o equivalente a três vezes o volume aproximado da perda durante a hemorragia (AMERICAN COLLEGE OF SURGEONS, 2004). No choque séptico ou endotóxico, o volume de solução salina a ser infundido inicialmente pode atingir ou até ultrapassar os valores para a volemia calculada do paciente (RIVERS *et al*, 2001). A infusão de grandes volumes de solução salina pode associar-se a aumento do volume do interstício e/ou intracelular na evolução clínica do paciente (CHOI *et al*, 1999). O uso de pequenos volumes de SH 7,5% (calculado como 4ml/Kg de peso corporal) poderia evitar ou diminuir os potenciais efeitos negativos atribuíveis ao aumento de água livre no extravascular após o uso dos volumes preconizados de solução salina (VICTORINO *et al*, 2003).

Levando-se em conta a extensão do território vascular envolvido na irrigação do trato gastrointestinal, consideramos a otimização do volume intravascular nas condições de isquemia/reperfusão intestinal como um fator crítico para atenuação das reações adversas descritas nos parágrafos anteriores. A melhora do débito cardíaco, a correção rápida do volume intravascular, a melhora da perfusão na microcirculação e sua ação anti-inflamatória parecem acreditá-la como ótima opção de tratamento.

A infusão de soluções cristalóides para expansão do espaço intravascular, no momento que precede a reperfusão do intestino, poderia ajudar no restabelecimento mais rápido e eficaz dos parâmetros cardiocirculatórios. Admite-se que, dessa maneira, ocorreria uma atenuação das respostas deletérias decorrentes da reperfusão desse extenso território que foi submetido à isquemia. Essa foi a nossa hipótese de trabalho. Utilizando um modelo experimental de isquemia intestinal transitória em ratos, analisamos o impacto da infusão de soluções cristalóides nas respostas de estresse oxidativo e de inflamação. A infusão de solução salina isotônica (≈ 33.2 ml/Kg de peso) ou de solução salina hipertônica 7.5% (4 ml/Kg de peso) foram comparadas à isquemia intestinal sem tratamento e, também, com animais submetidos a uma isquemia “falsa”.

Materiais e Métodos

Foram utilizados ratos Wistar, machos, 250 g a 300 g de peso corporal, número total 102, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. O protocolo experimental foi avaliado e aprovado pela Comissão de Avaliação de Protocolos de Pesquisa (CAPPesq) da Instituição sob o número 067/06.

Procedimento cirúrgico

Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura, umidade do ar e pressão atmosférica. Receberam alimentação e água *ad libitum*. Os experimentos foram realizados à mesma hora da manhã (entre 8hs e 9hs). No dia do experimento, os animais foram trazidos ao laboratório experimental em gaiolas individuais. Os animais foram pré-anestesiados com solução 2% hipocloridrato de xilazina (5 mg/Kg de peso corporal, *im*). A anestesia geral foi induzida com pentobarbital sódico (30mg/Kg de peso corporal, *ip*). A anestesia geral foi suplementada, sempre que necessário (pentobarbital sódico, 10 ml/Kg de peso corporal, *iv*), quando foram identificados sinais sugestivos de sofrimento do animal. Os critérios utilizados para suplementação da anestesia foram: observação clínica, pressão arterial e frequência cardíaca ou respiratória.

Os animais foram submetidos à intubação orotraqueal (cânula de polietileno com 1,7 mm de diâmetro interno) com o objetivo de manter as vias aéreas pérvias e para aspiração de secreções traqueobrônquicas. Realizamos tricotomia da região cervical anterior, cervical posterior e abdominal. A partir de então, todos os procedimentos passaram a ser assépticos. Assepsia da pele foi realizada com solução alcoólica de poliodopovidona. Todas as incisões de pele foram precedidas pela infiltração de anestésico local no seu trajeto (solução 2% lidocaína sem vasoconstrictor).

Uma incisão cervical anterior permitiu a identificação, dissecação e cateterização da artéria carótida comum direita e da veia jugular externa direita (cateter de polietileno P10). Os cateteres foram fixados aos vasos, dirigidos pelo subcutâneo e exteriorizados pela região cervical posterior. O cateter arterial foi utilizado para o monitoramento contínua da pressão arterial média (*Biopac® Systems, Inc., Santa Barbara, CA, USA*) durante o procedimento cirúrgico e para controle intermitente no pós-operatório. O cateter venoso foi utilizado para infusão de anestésico quando necessário e para infusão das soluções cristalóides quando aplicada. A incisão cervical anterior foi suturada com fio Mononylon® 3-0.

Uma incisão mediana de 4 centímetros na parede abdominal anterior permitiu o acesso à cavidade peritoneal e utilizando dissecação romba foi feita a identificação e isolamento da artéria mesentérica superior na sua origem junto à artéria aorta. As alças intestinais foram protegidas durante todo o ato cirúrgico com gaze umedecida com solução salina aquecida. Nesse momento, os animais foram sorteados para admissão em um dos quatro grupos experimentais: isquemia intestinal

falsa (IF) ou, simplesmente, *isquemia falsa*, terapêutica com *solução hipertônica* (SH), terapêutica com *solução salina isotônica* (SF) ou *isquemia sem tratamento* (ST) (ver abaixo).

Os animais sorteados para os grupos de isquemia intestinal tiveram a artéria mesentérica superior ocluída, na sua origem, com a ajuda de um clipe microvascular. A efetiva oclusão da artéria foi avaliada sob visão direta pela ausência de enchimento dos ramos vasculares do intestino, ausência de batimentos arteriais das arcadas mesentéricas e palidez do intestino. A cavidade foi lavada com solução salina aquecida à 38° C, as alças intestinais repostas no abdome e a incisão foi temporariamente fechada com pontos separados de fio Mononylon® 3-0. Os animais foram mantidos sob anestesia geral, observação contínua, controle de temperatura corporal (37 ° Celsius) e da pressão arterial média durante 40 minutos.

Decorridos 40 minutos o abdome foi novamente aberto e as alças intestinais examinadas para confirmar a eficácia da isquemia. Os sinais que foram observados e considerados como diagnósticos da isquemia completa foram: palidez, atonia e edema das alças intestinais. Uma observação frequente, porém não excludente, foi a presença de equimoses em alças intestinais. Ao completarmos 45 minutos de isquemia intestinal, o clipe vascular foi removido da artéria mesentérica superior e o restabelecimento do fluxo arterial pela do retorno dos batimentos arteriais das arcadas mesentéricas hiperemia das alças intestinais.

A cavidade abdominal foi lavada com solução salina fisiológica aquecida e as alças intestinais foram repostas no abdome. Nesse tempo cirúrgico, a parede abdominal foi infiltrada com anestésico local (lidocaína 2%, sem vasoconstrictor) e

foi fechada em plano único, em sutura contínua, com fio Mononylon® 3-0. Nesse momento, foi realizado novo sorteio para a alocação do animal, em cada grupo experimental, em referência ao período de sobrevida proposto: 2 horas, 4 horas ou 6 horas (ver abaixo). Os animais foram recuperados da anestesia sob observação rigorosa e a cânula traqueal foi retirada no momento oportuno. Em todas as fases do pós-operatório, os animais que apresentaram recuperação clínica pobre ou mostraram evidências de sofrimento intenso foram submetidos à eutanásia de maneira humanamente adequada.

Protocolo Experimental

Os animais foram separados em grupos experimentais diferentes seguindo dois sorteios em momentos distintos, o primeiro (para a forma de tratamento) logo após a dissecação da artéria mesentérica superior e o segundo (para o tempo de sobrevida) logo após o fechamento da parede abdominal ao término dos procedimentos cirúrgicos. O primeiro sorteio separou os animais em quatro grupos experimentais: animais submetidos à isquemia falsa (IF), animais tratados com solução hipertônica de cloreto de sódio a 7,5% (SH) ou tratados com solução salina fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% (SF) ou animais sem tratamento (ST). O segundo sorteio definiu em cada grupo de tratamento o período de sobrevida: 2 horas, 4 horas ou 6 horas de reperfusão intestinal (Figura 5).

Figura 5- Após a cateterização arterial e venosa, dissecação e exposição da Artéria Mesentérica Superior (Preparo Inicial), os animais foram sorteados nos grupos, Isquemia falsa (IF), Isquemia e tratamento com solução hipertônica de cloreto de sódio (SH) ou solução salina fisiológica (SF) e Isquemia sem tratamento (ST). Após 40 minutos de isquemia, realizada infusão de *iv* de SH 7,5% e SF 0,9% durante 5 minutos, nos grupos SH e SF respectivamente. Após 45 minutos de isquemia, retirado o clipe da AMS (reperfusão) e realizado novo sorteio para determinar o tempo para eutanásia.

No grupo SH, a infusão de solução hipertônica de cloreto de sódio a 7,5% (SH 7,5%) foi feita em volume de 4 ml/Kg de peso corporal. No grupo SF, o volume calculado para infusão de solução salina fisiológica de cloreto de sódio a 0,9% (SF 0,9%), foi de 33 ml/kg de peso corpóreo, considerando a mesma quantidade de cloreto de sódio que estaria contida num volume de SH 7,5% que hipoteticamente seria prescrito para o animal. Portanto 4 ml da solução SH 7,5% contém mesma quantidade de cloreto de sódio existente em 33 ml da solução SF 0,9%. As soluções foram infundidas durante os 5 minutos que precederam o início da perfusão

intestinal. As infusões foram realizadas através do cateter instalado na veia jugular externa.

Os animais sorteados para o grupo de isquemia falsa foram submetidos a todos os procedimentos: anestesia geral, posicionamento de cânula traqueal, dissecação e cateterização de artéria carótida comum e veia jugular externa, abertura da parede abdominal, identificação da artéria mesentérica superior, fechamento da parede abdominal, manutenção da anestesia geral, reabertura da parede abdominal após 40 minutos, manipulação das alças intestinais, fechamento definitivo da parede, recuperação e retirada da cânula traqueal.

Em períodos determinados de tempo (cinco minutos antes da reperfusão e duas, quatro e seis horas após a reperfusão), foram colhidas amostras de sangue através do cateter de veia jugular. As amostras de 0,5 ml cada, colhidas em seringas com anticoagulante (heparina), foram imediatamente centrifugadas em equipamento refrigerado a 4° C (*Centrifuge 5804 R[®], Eppendorf, Hamburg, Germany*) para separação do plasma. O plasma das amostras foi recolhido e armazenado em freezer - 80° C para análise posterior.

Os animais foram submetidos à eutanásia, de maneira humana, nos períodos sorteados para cada grupo, com injeção de pentobarbital (80 mg/Kg de peso corporal) seguido de toracotomia bilateral após a parada respiratória. Nesse momento, foram colhidas amostras de tecidos: pulmão (lobo superior e médio direitos), fígado (lobo esquerdo) e intestino delgado (íleo distal a 5 cm da válvula ileocecal).

As amostras de tecido foram lavadas com solução salina, identificadas e armazenadas em *freezer* à temperatura de -80 °C. Após o término de todos os experimentos, as amostras de tecido foram processadas em um único tempo para quantificação da concentração da interleucina 6, interleucina 10 e do malondialdeído. A atividade da mieloperoxidase foi avaliada nos tecidos segundo método químico. Após a coleta da amostra do pulmão, a árvore brônquica foi preenchida com solução de formol a 10% e os pulmões foram armazenados na mesma solução para fixação do tecido. No momento adequado, amostras do lobo inferior e médio, bilateralmente, foram incluídas em parafina. Foram realizados cortes na espessura de 5 µm e montados em lamina para coloração de hematoxilina e eosina.

Dosagem de Malondialdeído (MDA)

A dosagem de MDA é utilizada como representativa da produção das espécies reativas de oxigênio. As espécies reativas de oxigênio estão envolvidas em vários mecanismos de lesão e, um dos principais, é a peroxidação dos lipídeos das membranas celulares. Um método muito utilizado para a identificação dos produtos finais desse processo é a pesquisa das substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (*thiobarbituric acid reactive substances - TBARs*) (JANERO, 1990).

Para quantificação da produção de malondialdeído 100mg das amostras de pulmão, fígado e intestino foram homogeneizadas em 1 ml de KCl 1.15% com sonicador (*Polytron PT 3100®*, Kinematica Inc., Bohemia, New York, USA). Após a homogeneização as alíquotas foram centrifugadas a 10.000 giros por minuto durante 20 minutos a 4°C (*Centrifuge 5804R®*, Eppendorf, Hamburg, Germany). Para

reação, adicionou-se a 100 µl do sobrenadante, 100µl de duodecil sulfato de sódio (SDS) a 8,1%, 750 µl de ácido acético a 20 % e 750µl de ácido tiobarbitúrico (TBA) a 0,8%. A mistura foi aquecida por 50 minutos na temperatura de 95°C. Após o período estabelecido, amostras de 200 µl foram analisadas no espectrofotômetro a 532 nm (*GENios PlusTM® microplate reader - Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland*). Os resultados foram expressos em µg/mg de proteína (BRADFORD, 1976).

Dosagem da Mieloperoxidase (MPO)

A atividade da mieloperoxidase foi utilizada como índice de infiltração de neutrófilos nos tecidos. Aqui, 50 mg das amostras do pulmão, do fígado e do intestino foram homogeneizados em solução tampão (1 ml da solução tampão para 50 mg de cada amostra) em cúpula mantida fria com gelo na sua base. A solução tampão (pH=7,0) foi produzida com 0,5% Brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) diluído em solução 10mM de 3-*N*-ácido morfolinopropanesulfônico (MOPS). Para o processo de homogeneização as amostras foram trituradas com a ajuda de um sonicador (*Polytron PT 3100®*, *Kinematica Inc., Bohemia, New York, USA*) mantido em velocidade mediana durante 30 segundos (média de 15-20 choques do sonicador contra a mistura). O homogeneizado foi coletado e, então, centrifugado a 25000 giros por minuto durante 20 minutos a 4° C (*Centrifuge 5804 R®*, *Eppendorf, Hamburg, Germany*). A atividade da MPO foi medida no sobrenadante reagindo-se 20µl da amostra com 20 µl de tetrametil benzidina 16 mM em dimetilsulfoxido (DMSO) e 140µl de NaPP (80 mM NaH₂PO₄-H₂O, 80 mM

Na₂HPO₄·7H₂O, pH 5,5). Após 5 minutos adicionou-se 20 µl de H₂O₂ a 3 % às amostras. Realizada leitura por espectrofotometria a 650-655 nm a 37° C (*Tecan SunriseTM® microplate reader, Tecan Group Ltd, Mannedorf, Switzerland*) (GOLDBLUM *et al*, 1985). Os resultados foram expressos em Unidades de atividade de MPO por miligramas de proteína (BRADFORD, 1976).

Interleucinas 6 e 10

As interleucinas 6 e 10 foram analisadas no plasma e nos tecidos, utilizando-se uma reação antígeno e anticorpo que foi realizada seguindo-se as orientações do fornecedor do produto (*R&D SYSTEMS, Minneapolis- MN USA*). Para a dosagem no plasma foram utilizadas as amostras colhidas cinco minutos antes da reperusão, duas e quatro horas após reperusão do intestino nos grupos submetidos à isquemia ou em tempos equivalentes nos animais submetidos à isquemia falsa.

Para as dosagens nos tecidos, 100mg de cada amostra de pulmão, fígado ou intestino foram submetidas à rápida congelação com nitrogênio líquido. Esse processo levou à rápida desintegração do tecido. As amostras foram, então, homogeneizadas em 1 ml de solução de KCl 1.15% com a ajuda de um sonicador (*Polytron PT 3100®, Kinematica Inc., Bohemia, New York, USA*). O homogeneizado foi centrifugado a 10000 giros por minuto na temperatura de 4° C (*Centrifuge 5804 R®, Eppendorf, Hamburg, Germany*) durante 20 minutos. Foram colhidas alíquotas de 100 µl do sobrenadante para serem submetidas às reações para identificação das interleucinas.

As dosagens de IL-6 e IL-10 foram feitas por ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*), com ensaio imuno-enzimático tipo Anticorpo-Antígeno-Anticorpo. Anticorpos primários de captura específicos para IL- 6 e IL- 10. (*DuoSet® anti-rat IL6 e IL 10 monoclonal antibodies; RD SYSTEMS Minneapolis,MN, USA*) foram pré-fixados em placas de ELISA com 96 células de leitura e as placas foram incubadas durante 12 horas a 4 ° C. As células foram lavadas três vezes com solução tampão fosfato (PBS) com 0,05% *Tween-20* (*Polyoxyethylenesorbitan monooleate, RD®, USA*) que doravante será referida como solução padrão.

A seguir foram introduzidas em cada célula das placas de ELISA, 300 µl de soro bovino fetal 1 % em solução salina tamponada com fosfato em pH de 7,2 (diluyente reagente) para bloqueio das placas que foram incubadas na temperatura de ambiente por uma hora.

Após uma hora, as placas foram lavadas por cinco vezes com solução padrão. A seguir, foram adicionadas em cada célula da placa alíquotas de 100 µl de cada amostra. A incubação foi mantida por duas horas com as placas cobertas com adesivos e ao término desse período, as placas foram novamente lavadas por cinco vezes com a solução padrão. Neste momento foi adicionado 100 µl do anticorpo monoclonal de detecção ligado à biotina (*Biotinylated anti-rat, RD SYSTEMS® Minneapolis MN USA*) com diluyente reagente. As placas foram novamente cobertas com adesivo e incubadas em temperatura ambiente. Depois de decorrido uma hora do seu início, a reação foi interrompida com a lavagem das placas com a solução padrão (cinco passagens). Nesse momento, a cada célula foi adicionada 100 µl de HRP (*horseradish peroxidase*) conjugada a estreptavidina com o objetivo de permitir a

agregação desse complexo molecular à biotina (ligada ao anticorpo de detecção). Para tanto, mantivemos um tempo de 20 minutos em temperatura ambiente para que essa integração ocorresse. Mais uma vez, a reação foi encerrada com a lavagem das placas com a solução padrão (sete passagens).

Finalmente, para identificação do complexo *interleucina/anticorpo de detecção-biotina/estreptavidina-HRP* nós adicionamos 100 µl de solução de tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio a cada célula. A tetrametilbenzidina é um cromógeno que precipita em soluções que contém oxigênio livre e, portanto, a oferta de peróxido de hidrogênio às células da placa permitiu a localização do complexo que continha a HRP (peroxidase do rábano silvestre – *horseradish peroxidase*). Para tanto, a placa foi incubada, em ambiente escuro, com as soluções para que a reação ocorresse. Depois de decorridos 20 minutos, a reação foi encerrada pela adição a cada célula de 50µL de solução 1 M de H₃PO₄. A placa foi levada para leitura em espectrofotometria (comprimento de onda 570 nm). Na placa, as duas colunas da esquerda foram utilizadas para a construção de uma curva padrão, feita a partir de concentrações conhecidas da interleucina em estudo (*Standard, RD SYSTEMS®, USA*). As amostras foram estudadas em duplicata e utilizamos a média aritmética entre as duas leituras de cada amostra. Os resultados das amostras nos tecidos são apresentadas em pg/mg de proteína de tecido e no plasma em pg/ml.

Análise estatística

A análise estatística foi feita usando programa Sigmastat® 3.1 (*Systat Software Inc., San Jose, CA, USA*). Os resultados de MDA, MPO, IL-6 e IL-10 são apresentados por médias e erro padrão das médias ($\pm$ SEM). As diferenças entre grupos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA *two ways*) com o método de Holm Sidak como Post-hoc test. A correlação na produção de IL- 6 e IL-10 foi testada pelo método de Spearman. A sobrevida foi avaliada pelo método de Kaplan-Meier. Os valores de PAM são apresentados pelas médias. Foi considerado significativo o valor de $p \leq 0.05$.

Resultados

Mortalidade

A mortalidade foi calculada pela relação entre o número de animais que morreram antes do tempo previsto para eutanásia (duas, quatro e seis horas após reperfusão), e o número de animais que estavam vivos no início de cada intervalo de tempo (zero a duas, duas a quatro e quatro a seis horas após reperfusão). Durante o estudo, 18 animais (17,64% do total de 102 animais) morreram antes do tempo pré-estabelecido para eutanásia; sendo que no grupo IF morreram quatro de 30 animais (13,3%), no grupo SH cinco de 25 animais (20,0%), no grupo SF três de 25 animais (12,0%), e no grupo ST seis de 22 animais (27,3%). As mortes em todos os grupos estiveram concentradas no período de até 4 horas após a reperfusão. Somente um animal do grupo não tratado morreu no período de 4 a 6 horas. A distribuição desta mortalidade nestes três períodos é demonstrada na figura 6 e na Tabela 1.

Figura 6- Mortalidade (%) em relação ao número de animais vivos no início de cada período de observação (de zero a duas horas = 0-2H; duas a quatro horas=2-4H; e quatro a seis horas = 4-6H) após reperusão; em cada grupo experimental, isquemia falsa (IF), isquemia/reperusão e tratamento com SH 7,5% (SH), isquemia/reperusão e tratamento com SF 0,9% (SF) e isquemia/reperusão sem tratamento (ST). Método de Kaplan-Meier.

Tabela 1- Mortalidade em % de óbitos em relação ao nº de animais vivos no início de cada intervalo de tempo para cada grupo (IF, SH,SF,ST), e mortalidade geral nos 3 períodos

	IF	SH	SF	ST
Até 2 hs	3,3	8,0	8,0	18,2
2-4 hs	12,5	18,8	7,1	7,7
4-6 hs	0,0	0,0	0,0	20,0
3 períodos	13,3	20,0	12,0	27,3

A sobrevida após seis horas de observação da reperfunção intestinal, avaliada pelo método de Kaplan-Meier, foi de 84,1 % no grupo IF, 74,8% no grupo SH, 85,4% no grupo SF e 62,9% no grupo ST (figura 2). Apesar da tendência a uma mortalidade maior no grupo ST, não houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,439$). (Figura 7).

Figura 7 –Sobrevida acumulada em porcentagem, no período até seis horas após reperfunção intestinal, nos grupos isquemia falsa (IF), isquemia/reperfunção e tratamento com SH 7,5% (SH), isquemia/reperfunção e tratamento com SF 0,9% (SF) e isquemia/reperfunção sem tratamento (ST).

Pressão Arterial Média – PAM

A pressão arterial média (PAM) foi monitorada continuamente desde a cateterização da artéria carótida comum até o fim do procedimento cirúrgico. Após o fechamento definitivo da parede abdominal, a pressão arterial foi monitorada de maneira intermitente em períodos determinados ou sempre que houve suspeita de dor ou sofrimento do animal. Por ocasião da eutanásia a PAM foi novamente monitorada.

A PAM permaneceu estável e sem diferença entre os grupos desde o a cateterização da artéria carótida até o momento que antecedeu a reperfusão do intestino. Os animais dos grupos SH, SF e ST apresentaram queda da PAM para 88 mmHg, 95 mmHg, e 85 mmHg respectivamente, enquanto o grupo controle (IF) mantinha PAM de 110 mmHg, logo após a reperfusão. Dez minutos após a reperfusão os valores da PAM dos grupos SH, SF e ST retornaram para aos níveis pré-reperfusão. Este tempo de dez minutos foi utilizado por ser o tempo gasto para fechamento da cavidade antes da recuperação anestésica.

Por ocasião da eutanásia, novamente sob anestesia geral foi feita nova aferição da PAM onde se observou uma queda global em relação aos parâmetros no início do experimento (PAM inicial de 117 mm Hg e PAM na eutanásia de 101 mm Hg), porém não houve diferença entre os grupos estudados incluindo o grupo controle. (Figura 8 e Tabela 2).

Figura 8- Pressão Arterial Média (PAM) nos grupos isquemia falsa (IF), isquemia/reperfusão e tratamento com SH 7,5% (SH), isquemia/reperfusão e tratamento com SF 0,9% (SF) e isquemia/reperfusão sem tratamento (ST), nos momentos antes e após oclusão de AMS, pré-reperfusão, imediatamente e dez minutos após reperfusão e na eutanásia. $p < 0,001$ *IF vs Todos

Tabela 2- Pressão Arterial Média em mm de Hg, nos tempos: pré-oclusão (Pré-ocl) e após oclusão (Pós-ocl) da AMS, pré-reperfusão (Pré-rep) e pós reperfusão (Pós-rep) intestinal, 10 minutos após reperfusão (10' Pós-rep) e na eutanásia

	Pré-ocl	Pós-ocl	Pré-rep	Pós-rep	10' Pós-rep	Eut
IF	109	109	113	113*	113	102
SH	124	125	126	89	108	97
SF	118	124	127	90	103	94
ST	118	117	121	86	102	87

$p < 0,001$ IF vs Todos

Malondialdeído

A peroxidação lipídica associada ao estresse oxidativo foi avaliada pela produção de malondialdeído (MDA) nas amostras de intestino, fígado e pulmões. As concentrações de MDA nestes órgãos são apresentadas na figura 9 e na tabela 3. O padrão geral dos resultados foi semelhantes nos três órgãos avaliados. Os valores foram significativamente menores nos grupos de animais que receberam tratamento (SH e SF) quando comparado com os animais não tratados (ST) e semelhantes aos valores dos animais com isquemia falsa (IF) em cada período de estudo (duas horas, quatro horas ou seis horas após a reperusão). Os valores das concentrações de MDA são apresentados como média $\pm$ erro padrão em micromoles por miligrama ($\mu\text{mol/mg}$) de proteína dos tecidos.

Figura-9 MDA no Intestino (A), Fígado (B) e Pulmões (C) dos grupos com isquemia falsa (IF), tratados com SH 7.5% (SH) e SF 0.9% (SF) e sem tratamento (ST); Tempo de reperusão: legenda. Os valores são apresentados em micromoles por miligrama de proteína

Tabela 3 - Concentração de Malondialdeído nos Tecidos (Pulmão, Fígado e Intestino), nos grupos isquemia falsa (IF), isquemia/reperfusão tratados com SH 7,5% (SH), isquemia/reperfusão tratados com SF 0,9% (SF) e isquemia/reperfusão sem tratamento (ST) após duas (II), quatro (IV) e seis (VI) horas de reperfusão. Os valores são apresentados em microgramas por miligramas de proteína através das médias $\pm$ erro padrão.

Intestino	II		IV		VI	
IF	9,335	$\pm 3,713$	17,999	$\pm 2,876$	5,661	$\pm 2,876$
SH	8,197	$\pm 3,437$	19,098	$\pm 3,713$	2,469	$\pm 3,437$
SF	8,259	$\pm 3,031$	14,196	$\pm 3,437$	3,383	$\pm 3,713$
ST	29,754*	$\pm 4,067$	26,475	$\pm 3,713$	6,209+	$\pm 4,067$

* + p<0,001 vs todos grupos

Fígado	II		IV		VI	
IF	7,629	$\pm 3,836$	11,175	$\pm 2,971$	5,671	$\pm 2,971$
SH	13,512	$\pm 3,551$	11,758	$\pm 3,836$	4,359	$\pm 3,551$
SF	8,549	$\pm 3,132$	12,626	$\pm 3,551$	4,937	$\pm 3,836$
ST	43,84*	$\pm 4,202$	27,503+	$\pm 3,836$	20,708++	$\pm 4,202$

* + ++ p<0,001 vs todos grupos

Pulmões	II		IV		VI	
IF	16,449	$\pm 4,121$	29,081	$\pm 3,192$	13,51	$\pm 3,192$
SH	19,813	$\pm 3,816$	33,1	$\pm 4,121$	9,444	$\pm 3,816$
SF	17,941	$\pm 3,365$	28,286	$\pm 3,816$	9,277	$\pm 4,121$
ST	41,027*	$\pm 4,515$	52,498+	$\pm 4,121$	42,841++	$\pm 4,515$

* + ++ p<0,001 vs todos grupos

Mieloperoxidase

A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi utilizada para avaliar infiltração de neutrófilos nos tecidos. A atividade de MPO nos diferentes órgãos é mostrada na figura 10 e na tabela 3. Assim como na dosagem de MDA, os valores foram significativamente menores nos grupos tratados, SF ou SH, quando comparados com os animais não tratados, em cada momento estudado (2 horas, 4hours, ou 6 horas após o reperfusão). A atividade da MPO encontrada nos grupos tratados com soluções SH 7,5% e SF 0,9% foi similar à atividade encontrada nos animais do grupo IF. Os valores são apresentados pela média e erro padrão em unidades de atividade enzimática por miligrama (U/mg) de proteína dos tecidos.

Figura 10– Atividade da MPO no Intestino (A), Fígado (B) e Pulmões(C) dos animais dos grupos com isquemia falsa (IF), tratados com SH 7.5% (SH), tratados com SF 0.9% (SF) e sem tratamento (ST). Legenda: tempo após reperusão. Os dados são apresentados em unidades de atividade enzimática por miligrama de proteína de tecido.

Tabela 4- Atividade da mieloperoxidase nas amostras de intestino delgado, fígado e pulmões nos grupos de animais com isquemia falsa (IF), isquemia/reperfusão tratados com SH 7,5% (SH), isquemia/reperfusão tratados com SF 0,9% (SF) e isquemia/reperfusão sem tratados (ST); duas (II), quatro (IV) e seis (VI) horas após reperfusão. Os valores são apresentados e unidade por miligrama de proteína, através das médias $\pm$ erro padrão.

Intestino	II		IV		VI	
IF	224,67	$\pm 42,632$	192,17	$\pm 63,449$	876,22	$\pm 91,887$
SH	339,40	$\pm 52,584$	363,00	$\pm 26,985$	800,92	$\pm 94,294$
SF	228,62	$\pm 44,358$	984,92	$\pm 76,724$	844,96	$\pm 86,89$
ST	127,70	$\pm 47,666$	846,82*	$\pm 90,985$	1231,69+	$\pm 78,827$

*p< 0,01 vs todos grupos

+p< 0,05 vs todos grupos

Fígado	II		IV		VI	
IF	344,57	$\pm 18,087$	319,80	$\pm 22,409$	1439,10	$\pm 209,652$
SH	307,41	$\pm 44,654$	326,80	$\pm 22,871$	1139,12	$\pm 87,73$
SF	368,85	$\pm 29,478$	1244,94	$\pm 63,412$	1396,40	$\pm 102,482$
ST	385,12*	$\pm 28,932$	1733,88+	$\pm 341,935$	1498,74++	$\pm 96,419$

* + ++ p< 0,001 vs todos grupos

Pulmão	II		IV		VI	
IF	291,09	$\pm 33,72$	322,52	$\pm 47,207$	716,88	$\pm 76,475$
SH	198,82	$\pm 13,941$	209,59	$\pm 31,165$	768,02	$\pm 100,524$
SF	104,36	$\pm 21,276$	112,83	$\pm 36,137$	912,39	$\pm 124,105$
ST	100,76*	$\pm 35,554$	962,93+	$\pm 60,925$	920,56++	$\pm 103,108$

* + ++ p< 0,001 vs todos grupos

Interleucina 6 no Intestino, Fígado e Pulmões

As concentrações de Interleucina 6 (IL -6) foram analisadas nas amostras de intestino, fígado e pulmões, duas, quatro e seis horas após a reperfusão. Não houve diferença nas concentrações de IL -6 entre todos os grupos do estudo para cada um dos tecidos no período de duas horas após a reperfusão. Quatro horas após a reperfusão intestinal, as concentrações de IL-6 foram significativamente maiores no intestino dos grupos SF e ST quando foram comparados com os grupos IF e SH. No período de quatro horas após a reperfusão houve, também, aumento nas concentrações de IL-6 no fígado dos grupos SF e ST. Neste mesmo período, observamos uma concentração maior de IL -6 no pulmão do grupo ST em relação aos demais grupos. Seis horas após a reperfusão encontramos um aumento global na concentração de IL -6 nos tecidos de todos os grupos de estudo. Neste período apenas no intestino a concentração de IL-6 foi maior no grupo ST em relação aos demais grupos. Os valores são apresentados em picogramas por miligrama (pg/mg) de proteína dos tecidos pela média e erro padrão (Tabela 5 e Figura 11).

Figura 11- Concentração de IL-6 no intestino (A), fígado (B) e pulmões (C) dos grupos de animais com isquemia falsa (IF), isquemia e tratados com SH 7,5% (SH) ou com SF 0.9% (SF) e sem tratamento (ST). Tempo após reperusão: legenda. Os dados são apresentados em picogramas por miligrama de proteína.

Tabela 5 - Concentração de Interleucina 6 nos Tecidos (Pulmão, Fígado e Intestino), nos grupos isquemia falsa (IF), isquemia/reperfusão tratados com SH 7,5% (SH), isquemia/reperfusão tratados com SF 0,9% (SF) e isquemia/reperfusão sem tratamento (ST) após duas (II), quatro (IV) e seis (VI) horas de reperfusão. Os valores são apresentados em picogramas por miligramas de proteína através das médias $\pm$ erro padrão.

Intestino	II		IV		VI	
IF	224,67	$\pm 42,632$	192,17	$\pm 63,449$	876,22	$\pm 91,887$
SH	339,40	$\pm 52,584$	363,00	$\pm 26,985$	800,92	$\pm 94,294$
SF	228,62	$\pm 44,358$	984,923*	$\pm 76,724$	844,96	$\pm 86,89$
ST	127,70	$\pm 47,666$	846,828+	$\pm 90,985$	1231,69++	$\pm 78,827$

*+ p< 0,05 vs IF e SH

++ p< 0,05 vs todos grupos

Fígado	II		IV		VI	
IF	344,57	$\pm 18,087$	319,80	$\pm 22,409$	1439,10	$\pm 209,652$
SH	307,41	$\pm 44,654$	326,80	$\pm 22,871$	1139,12	$\pm 87,73$
SF	368,85	$\pm 29,478$	1244,944*	$\pm 63,412$	1396,40	$\pm 102,482$
ST	385,12	$\pm 28,932$	1733,883+	$\pm 341,935$	1498,74	$\pm 96,419$

* p<0,01 vs IF e SH +p<0,05 vs IF e SH

Pulmões	II		IV		VI	
IF	291,09	$\pm 33,72$	322,52	$\pm 47,207$	716,88	$\pm 76,475$
SH	198,82	$\pm 13,941$	209,59	$\pm 31,165$	768,02	$\pm 100,524$
SF	104,36	$\pm 21,276$	112,83	$\pm 36,137$	912,39	$\pm 124,105$
ST	100,77	$\pm 35,554$	962,92*	$\pm 60,925$	920,56	$\pm 103,108$

* p< 0,05 vs todos grupos

Interleucina 10 no Intestino, Fígado e Pulmões

O padrão da concentração de interleucina 10 (IL-10) nos tecidos foi muito semelhante ao padrão da concentração de IL -6. Duas horas após a reperfusão, não houve diferença entre os grupos (IF, SH, SF, ST) em todos os tecidos (Intestino, Fígado e Pulmões). Analogamente a IL-6, quatro horas após a reperfusão, as concentrações de IL-10 foram significativamente mais elevadas no intestino e fígado dos grupos SF e ST em comparação com os grupos IF e SH. Quando observamos os pulmões neste período, notamos que concentração de IL-10 foi maior apenas no grupo ST em relação aos outros grupos. Seis horas após a reperfusão, os níveis IL-10 aumentaram globalmente em todos tecidos e em todos os grupos. Neste tempo, a concentração de IL-10 no intestino foi maior no grupo ST. Neste período, a concentração de IL 10 no fígado foi significativamente mais elevada no grupo ST, quando comparados aos grupos IF e SH, porém semelhante ao grupo SF. Nos pulmões, seis horas após a reperfusão a concentração de IL-10 do grupo ST estava elevada em relação aos outros grupos. Os valores são apresentados pela média e erro padrão em picogramas por miligrama (pg/mg) de proteína dos tecidos (figura 12 e tabela 6)

Figura 12- Concentração de IL-10 no intestino (A), fígado (B) e pulmões (C) dos grupos de animais com isquemia falsa (IF), isquemia e tratados com SH 7.5% (SH) ou com SF 0.9% (SF) e sem tratamento (ST). Tempo após reperfusão: legenda. Os dados são apresentados em picogramas por miligrama de proteína.

Tabela 5 - Concentração de Interleucina 10 nos Tecidos (Pulmão, Fígado e Intestino), nos grupos isquemia falsa (IF), isquemia/reperfusão tratados com SH 7,5% (SH), isquemia/reperfusão tratados com SF 0,9% (SF) e isquemia/reperfusão sem tratamento (ST) após duas (II), quatro (IV) e seis (VI) horas de reperfusão. Os valores são apresentados em picogramas por miligramas de proteína através das médias $\pm$ erro padrão.

Intestino	II		IV		VI	
IF	206,44	$\pm 6,098$	239,52	$\pm 10,787$	877,18	$\pm 75,642$
SH	250,32	$\pm 24,617$	390,38	$\pm 48,377$	1077,18	$\pm 268,576$
SF	154,73	$\pm 13,775$	1153,38*	$\pm 138,842$	1429,80	$\pm 249,411$
ST	330,20	$\pm 16,511$	1092,02+	$\pm 263,996$	2193,13++	$\pm 326,083$

* + p< 0,005 vs IF e SH

++ p< 0,005 vs todos grupos

Fígado	II		IV		VI	
IF	186,56	$\pm 10,734$	331,95	$\pm 52,596$	1098,99	$\pm 107,078$
SH	190,79	$\pm 20,771$	241,34	$\pm 9,294$	1340,27	$\pm 25,110$
SF	154,19	$\pm 10,679$	1398,05*	$\pm 86,191$	1447,16+	$\pm 118,062$
ST	226,83	$\pm 15,557$	1543,30++	$\pm 142,054$	1641,26#	$\pm 77,832$

* p< 0,05 vs IF e SH + p=0,01 vs IF ++ p< 0,05 vs IF e SH # p< 0,05 vs IF e SH

Pulmão	II		IV		VI	
CF	145,99	$\pm 31,842$	185,73	$\pm 18,897$	491,33	$\pm 73,239$
SH	93,04	$\pm 19,246$	145,11	$\pm 32,384$	607,66++	$\pm 50,776$
SF	99,76	$\pm 20,914$	244,22	0,00	339,28	$\pm 16,613$
ST	129,64	$\pm 16,171$	681,67*	$\pm 114,569$	1106,60+	$\pm 134,317$

* + p< 0,05 vs todos grupos

++ p=0,017 vs SF

Interleucina 6 e Interleucina 10 no plasma

As concentrações plasmáticas de Interleucinas 6 e 10 foram estudadas em três tempos: imediatamente anterior a reperfusão (tempo zero hora), duas horas e quatro horas após a reperfusão, sendo comparadas entre grupos sem isquemia (IF), isquemia e reperfusão tratados com SH 7,5% (SH) e SF 0,9% (SF) e sem tratamento (ST).

No tempo imediatamente anterior a reperfusão (tempo zero), não há diferença na concentração de IL 6 entre os grupos. Após o período de 2 horas de reperfusão, IL-6 teve concentrações significativamente mais elevadas no plasma de animais tratados com solução hipertônica (SH). Quatro horas após a reperfusão esta concentração plasmática de IL-6 continuou maior no grupo SH quando comparado com os outros grupos. Os resultados estão apresentados na figura 9 e na tabela 7 e são apresentados pelas médias e erro padrão em picogramas por mililitro (pg/ml).

Em relação à concentração plasmática de IL-10, no tempo zero foi maior no grupo tratado com solução hipertônica em relação ao grupo IF e sem diferença em relação aos demais grupos. Nos tempos seguintes houve uma tendência para valores mais elevados nos animais tratados com SH quando comparados aos outros grupos sem diferença estatística. Os dados são apresentados na e na figura 13 e tabela 8 pelas medias e erro padrão em picograma por mililitro de plasma (pg/ml)

Figura 13- Concentração plasmática de IL-6 (A) e IL -10 (B), nos grupos com isquemia falsa (IF), isquemia e tratamento com SH 7,5% (SH), isquemia e tratamento com SF 0,9% (SF) e isquemia sem tratamento (ST). Tempos avaliados: legenda. Os dados são apresentados em pg/ml de plasma.

Tabela 6 - Concentração de Interleucina 6 e Interleucina 10 no plasma, nos grupos isquemia falsa (IF), isquemia/reperfusão tratados com SH 7,5% (SH), isquemia/reperfusão tratados com SF 0,9% (SF) e isquemia/reperfusão sem tratamento (ST), na reperfusão (zero), e duas (II) e quatro (IV) horas após a reperfusão. Os valores são apresentados em picogramas por mililitro de plasma através das médias $\pm$ erro padrão.

IL 6	zero		II		IV	
IF	43,61	$\pm 9,448$	62,24	$\pm 20,674$	72,90	$\pm 24,008$
SH	31,84	$\pm 3,259$	233,89*	$\pm 84,109$	288,06+	$\pm 135,523$
SF	28,08	$\pm 3,593$	54,62	$\pm 4,127$	44,33	$\pm 1,725$
ST	26,30	$\pm 3,639$	45,74	$\pm 14,876$	76,15	$\pm 18,81$

* + p < 0,001 vs todos grupos

IL 10	zero		II		IV	
IF	3,41	$\pm 0,857$	7,93	$\pm 3,622$	7,29	$\pm 2,702$
SH	53,68*	$\pm 10,009$	18,15	$\pm 5,999$	39,01	$\pm 21,268$
SF	26,38	$\pm 13,004$	12,41	$\pm 1,475$	24,32	$\pm 12,198$
ST	18,01	$\pm 13,902$	23,56	$\pm 19,826$	20,26	$\pm 10,078$

* p < 0,05 vs IF

Correlação na produção de IL-6 e IL-10

Através da correlação de Spearman avaliamos se existe correlação na produção de marcadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios nos grupos estudados (IF, SH, SF, ST). A correlação de Spearman é representada pela letra grega ρ (Rô), cujos valores variam de +1 a -1, sendo $\rho = +1$, uma correlação totalmente positiva e $\rho = -1$ uma correlação totalmente negativa; o valor zero representa que não há nenhuma correlação. Quando avaliamos a correlação na produção de IL-6 e IL-10 nos tecidos, observamos uma correlação muito forte com $\rho = 0.813$ no Intestino, $\rho = 0.732$ no fígado e $\rho = 0.858$ nos pulmões. Analisando a mesma correlação entre a concentração plasmática de IL-6 e IL-10 o valor observado foi $\rho = 0.432$, considerada uma correlação moderada. Os resultados são apresentados na figura 14.

Figura 14- Correlação pelo método de Spearman (ρ) na produção de IL -6 e IL -10 nos tecidos: Intestino (A) $\rho = 0.813$, Fígado (B) $\rho = 0.732$ e Pulmões (C) $\rho = 0.858$; e na concentração plasmática de IL-6 e IL-10 (D) $\rho = 0.432$ avaliando todos os grupos de animais (IF, SH, SF e ST) em conjunto.

Discussão

O objetivo deste trabalho foi descrever o curso inicial de dois eventos adversos relacionados (o estresse oxidativo e a reação inflamatória) em um modelo experimental de isquemia intestinal transitória e moderada em ratos. Foi avaliado o impacto na atenuação desses dois eventos com a utilização de solução salina hipertônica (SH 7,5%) e solução salina isotônica (SF 0,9%) em diferentes volumes. Estabelecemos o critério de análise precoce e estudamos as alterações de marcadores sensíveis desses eventos no período de 6 horas após a reperfusão intestinal.

O estudo da isquemia mesentérica no laboratório de pesquisa é realizado utilizando-se vários modelos experimentais como oclusão temporária da artéria mesentérica superior, isquemia permanente em segmentos da circulação mesentérica e modelos de choque hemorrágico (SCHOENBERG & BERGER, 1993; KHANNA *et al*, 2001; ATTUWAYBI *et al*, 2004a; NEZU, 2008). Alguns autores consideram estes modelos de isquemia do intestino como similares (KOZAR *et al*, 2004), enquanto outros observaram diferenças na resposta inflamatória entre esses modelos (GROTZ *et al*, 1995). Em nosso modelo, realizamos uma interrupção abrupta da circulação mesentérica pela oclusão da artéria mesentérica superior (AMS) na sua emergência da aorta.

É esperado que a exclusão de um amplo território da circulação, representado pela área irrigada pela AMS, desencadeie, momentaneamente, um quadro de aumento do volume intravascular no restante da árvore circulatória. Alterações hemodinâmicas devem ocorrer rapidamente para o ajuste do débito cardíaco à situação atual de menor árvore circulatória (KHANNA *et al*, 2001; DE PAOLA *et al*,

2005). Na situação oposta, logo após a reperfusão do intestino delgado, teremos transitoriamente, um menor volume intravascular que deverá ser distribuído para um território de circulação mais extenso (KHANNA *et al*, 2001; DE PAOLA *et al*, 2005). Necessariamente, novos ajustes hemodinâmicos serão essenciais para a manutenção da perfusão adequada na circulação sistêmica (BAGSHAWA & BELLOMO, 2007).

Acredita-se que a expansão do volume intravascular com a infusão de soluções cristalóides, no momento que precede a liberação do fluxo mesentérico, poderia minimizar as alterações hemodinâmicas que acompanham a lesão da reperfusão intestinal (BAGSHAWA & BELLOMO, 2007; SUZUKI *et al*, 2008a). Dessa maneira, a manutenção de condições fisiológicas mais adequadas levaria a atenuação das respostas deletérias sistêmicas causadas por oscilações da perfusão tecidual.

Após o restabelecimento do fluxo arterial em um órgão previamente isquêmico, a eficiência da perfusão tecidual é o fator crítico na intensidade da resposta do estresse oxidativo e da reação inflamatória local podendo, inclusive, estar associada à generalização desses eventos (NIEUWENHUIJZEN & GORIS, 1999; LI & JACKSON, 2002; YASUHARA, 2005). Neste estudo, nós comparamos formas diferentes de reposição do volume intravascular em relação à atenuação das respostas locais e sistêmicas do estresse oxidativo e das reações inflamatórias após isquemia seguida de reperfusão no intestino.

A reposição do volume circulatório foi realizada com duas soluções cristalóides: uma contendo cloreto de sódio em concentração fisiológica e a outra

composta de cloreto de sódio na concentração de 7,5 g/100 ml. Essas soluções foram administradas por via endovenosa e nos volumes descritos na literatura científica (ATTUWAYBI *et al*, 2004a; GONZALEZ *et al*, 2006), ou seja, a solução salina fisiológica foi utilizada em um volume cerca de 8 vezes superior ao da solução de cloreto de sódio a 7,5% (33 ml/Kg de peso corporal para a solução salina fisiológica e 4 ml/Kg de peso corporal para a solução 7,5% de cloreto de sódio). Os resultados foram comparados aos obtidos com animais submetidos à isquemia intestinal falsa (aqui denominados, simplesmente, isquemia falsa) e animais que não receberam reposição de volume circulatório. Os resultados apresentados na seção anterior mostram, claramente, que a reposição do volume circulatório com as duas soluções cristalóides levou à atenuação do estresse oxidativo e das reações inflamatórias neste modelo experimental.

A lesão irreversível, que levará à morte celular, é dependente do tempo de duração do bloqueio ou diminuição da perfusão tecidual (HAGLUND, 1994; FARBER *et al*, 1999; QUAEDACKERS *et al*, 2000; CHANG *et al*, 2005). O desencadeamento de mecanismos que levam à morte celular após a isquemia ocorre em períodos de tempo que variam para cada tipo de célula (WHITE *et al*, 2000; LI & JACKSON, 2002). O restabelecimento da perfusão sanguínea adequada em tempo apropriado é compatível com a preservação das células e, portanto, com a recuperação funcional do órgão comprometido. Entretanto, mesmo períodos curtos de isquemia transitória são responsáveis por inúmeras alterações no metabolismo celular que são desencadeados após a reperfusão do tecido (FARBER *et al*, 1999; SCHOOTS *et al*, 2003).

A produção aumentada de espécies reativas de oxigênio (estresse oxidativo) é o principal mecanismo na fisiopatologia das lesões teciduais causadas pela reperfusão de um órgão previamente isquêmico (LI & JACKSON, 2002). Em situações específicas, o estresse oxidativo pode assumir grandes proporções e desencadear alterações no meio interno que ultrapassam os limites da região previamente acometida (GTINEL *et al*, 1998; STALLION *et al*, 2005). É o que parece acontecer após um período de isquemia transitória do intestino. Devido à grande extensão, o intestino delgado submetido à isquemia, apresenta na condição de reperfusão, uma produção de espécies reativas de oxigênio que atinge um nível crítico, suficiente para promover alterações em órgãos distantes (STALLION *et al*, 2005).

As espécies reativas de oxigênio são representadas por moléculas que apresentam um único elétron na órbita mais externa do átomo de oxigênio que compõe a molécula (NORDBERG & ARNÉR, 2001). Essa característica aumenta o poder oxidante dessas moléculas, pois o átomo de oxigênio apresenta-se ávido para receber o segundo elétron na sua órbita externa e atingir a sua estabilidade química (NORDBERG & ARNÉR, 2001). Os principais representantes das espécies reativas de oxigênio são o superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) e o peroxinitrito ($HNO^{\cdot}$) (CERQUEIRA *et al*, 2005). As espécies reativas de oxigênio são produzidas regularmente durante o metabolismo aeróbico e as células dispõem de mecanismos eficientes para a sua neutralização. Esses mecanismos podem ser químicos (moléculas “sequestradoras” de espécies reativas de oxigênio) ou enzimáticos (superóxido dismutase, sistema da glutathione óxido redutase e catalase) (NORDBERG & ARNÉR, 2001).

Algumas moléculas que participam do metabolismo normal das células, a partir de mudanças na sua conformação, são capazes, de incorporar e, portanto, neutralizar as espécies reativas de oxigênio. O ácido ascórbico e o α -tocoferol são exemplos de “sequestradores” de espécies reativas de oxigênio (GTINEL *et al*, 1998; CUDDIHY *et al*, 2008). Os sistemas enzimáticos são responsáveis por reações que, em sequência, utilizam o superóxido para a produção de água e oxigênio (SASAKI & JOH, 2007). Em condições fisiológicas, esses sistemas de neutralização das espécies reativas de oxigênio são suficientes para a sua eliminação. Entretanto, em situações de produção aumentada das espécies reativas de oxigênio (como ocorre após a reperfusão de um órgão previamente isquêmico como o intestino delgado), os mecanismos de neutralização são esgotados e ocorre o estresse oxidativo (NORDBERG & ARNÉR 2001).

O principal mecanismo de lesão durante o estresse oxidativo se dá a partir da oxidação dos lipídeos constituintes das membranas biológicas pelas espécies reativas de oxigênio (NORDBERG & ARNÉR, 2001). Esse processo que compromete as membranas das organelas citoplasmáticas e a membrana celular é genericamente denominado de peroxidação lipídica. A alteração na constituição das membranas celulares modifica intensamente a fisiologia da célula (NAGIRA *et al*, 2006). Em situações extremas a peroxidação lipídica pode levar à morte celular pelo mecanismo de necrose da célula.

Em situações intermediárias, entretanto, o estresse oxidativo pode alterar os mecanismos de resposta celular, comprometendo a transcrição de fatores que modificam o metabolismo celular (NORDBERG & ARNÉR, 2001; MURAYAMA *et al*, 2006; SUZUKI *et al*, 2008b; YPSILANTIS *et al*, 2008). Como consequência,

essas alterações podem liberar as vias responsáveis pela produção de substâncias relacionadas aos processos inflamatórios e os mecanismos que levam à morte da célula por apoptose (LIU *et al*, 2008).

Nesse estudo, acompanhamos as alterações precoces de marcadores de estresse oxidativo e de inflamação após uma isquemia intestinal transitória em ratos. O impacto da reposição de volume intravascular com soluções cristalóides na atenuação dessas respostas foi analisado em diferentes grupos experimentais. O modelo utilizado foi o da oclusão temporária na origem da artéria mesentérica superior. Baseados em nossos próprios resultados de sobrevivência, consideramos que o modelo utilizado causou uma lesão de isquemia/reperfusão de grau moderado a grave. De uma maneira geral, a reposição intravascular com soluções cristalóides imediatamente antes da reperfusão atenuou as respostas de estresse oxidativo e de inflamação.

A oclusão da artéria mesentérica superior provoca agudamente, intensas alterações hemodinâmicas (KHANNA *et al*, 2001; CRUZ Jr *et al*, 2009). Como vimos, essa condição inicial pode ser considerada uma situação de hipervolemia relativa para o sistema circulatório (KHANNA *et al*, 2001). A exclusão de um extenso território visceral da circulação arterial leva a ajustes no sistema cardiocirculatório para acomodar o volume intravascular e o débito cardíaco a essa nova situação de diminuição de território a ser irrigado (FROJSE *et al*, 2004). Na situação oposta, após a liberação da artéria mesentérica superior, encontramos um menor volume intravascular para a perfusão da extensa área previamente excluída. Novos ajustes do sistema cardiocirculatório são essenciais para o restabelecimento

dos parâmetros hemodinâmicos (TØLLØFSRUD *et al*, 2001; DE PAOLA *et al*, 2005; WAISMAN *et al*, 2005).

Situações clinicamente adversas do organismo são responsáveis pelo desencadeamento de reações que tem como objetivo restabelecer o meio interno. A reação inflamatória é o principal mecanismo envolvido nesse processo (NIEUWENHUIJZEN & GORIS, 1999). Alterações limitadas a um determinado órgão ou sistema tendem a ser controladas e restritas ao local acometido até a sua completa resolução (STEINBERG *et al*, 2005). Entretanto, muitas vezes, a intensidade dessas alterações é suficiente para desencadear mudanças sistêmicas no organismo e, assim, comprometer a função de órgãos distantes ao local de início do quadro (STALLION *et al*, 2005). A resposta inflamatória sistêmica, quando não controlada, pode levar à falência múltipla de órgãos que é a principal causa de morte em pacientes internados em terapia intensiva (NIEUWENHUIJZEN & GORIS, 1999).

A liberação sistêmica de marcadores inflamatórios é seguida pelo desencadeamento de mecanismos antiinflamatórios que tem o objetivo de controlar a intensidade da inflamação e iniciar o processo de cura do organismo (GROTZ *et al*, 1995; LAMMERS *et al*, 2003). Os mecanismos envolvidos nessas respostas não são completamente conhecidos, entretanto, as suas etapas críticas parecem ocorrer nas primeiras horas que seguem a lesão inicial. Estudos clínicos e experimentais tem mostrado a importância das primeiras horas após o insulto no desencadeamento da falência múltipla de órgãos (TANIGUCHI *et al*, 1999). Nessa fase inicial, alguns órgãos são considerados essenciais para o controle do processo em curso ou na amplificação das respostas deletérias em evolução (NARITA *et al*, 2004). Os

pulmões e o fígado representam dois desses órgãos (CAVRIANI *et al*, 2004; NEZU *et al*, 2008). Acredita-se que o pulmão e o fígado possam, por si só, ativar uma nova onda de reposta inflamatória com comprometimento sistêmico, em um quadro já parcialmente controlado e em fase de resolução (LIU *et al*, 2008; TEKIN *et al*, 2008).

Nossos resultados de mortalidade atestam que o modelo experimental utilizado é responsável por uma isquemia intestinal de grau moderado a grave. Dessa maneira encontramos uma taxa de mortalidade nas primeiras seis horas de aproximadamente 30% para os animais que não receberam tratamento. Nossos resultados de mortalidade são coincidentes com o de outros autores que consideram a simples abertura da cavidade abdominal como responsável por um trauma moderado ao animal (SCHWARZ *et al*, 2002; THOMAS *et al*, 2002b; KALIA *et al*, 2005). Portanto, a taxa de mortalidade inicial de 12% para os animais submetidos à isquemia falsa pode ser atribuída ao desenho experimental proposto, onde os animais foram submetidos a duas aberturas da cavidade abdominal, anestesia geral prolongada e coleta de amostras de sangue. Corroborando a nossa hipótese de trabalho (ver acima) a pré-reposição do volume circulante com solução salina fisiológica diminuiu a taxa de mortalidade da isquemia intestinal para valores similares ao da isquemia falsa.

Um

resultado inesperado para o nosso estudo foi a taxa de mortalidade do grupo pré-tratado com SH 7,5%, que foi inferior apenas aos animais que não receberam tratamento. Aqui, algumas situações devem ser lembradas. A leitura crítica da literatura mostra o relato casual de índices de mortalidade elevados com o uso da SH

7,5% em diferentes modelos experimentais (HAGLIND & HALJAMÄE, 1992; RABINOVICI *et al*, 1992; HUANG *et al*, 1995; KRAUSZ, 1995; ROCH *et al*, 2008). Muitos desses autores atribuem esses índices de mortalidade a motivos não-relacionados ao uso da solução em si, porém, surpreendentemente, não contabilizam as mortes na análise de seus resultado (TAN *et al*, 2002; GONZALES *et al*, 2006).

Estudos recentes demonstram que a infusão rápida de SH 7,5% pode causar um estresse osmótico das células e, dessa maneira, modificar negativamente as respostas celulares (OLIVEIRA *et al*, 2002; VICTORINO *et al*, 2002; JÄRVELÄ *et al*, 2003; BURG *et al*, 2007). Assim, nossos resultados com o uso de SH 7,5% relativos à mortalidade nas primeiras horas após a reperfusão intestinal são compatíveis com a idéia de que a infusão rápida de soluções hiperosmolares não é completamente inócua ao metabolismo celular.

O meio intracelular deve ser encarado como constituído por várias regiões com funções diferentes, porém, efetivamente interligadas sob ponto de vista molecular. Olhando-se o exemplo simplificado da síntese protéica que segue: o recrutamento de moléculas de transcrição genética, a expressão do grupo de genes relacionados, a síntese da cadeia primária da proteína nos ribossomos, a ação coordenada das chaperonas na migração intracelular da proteína e sua liberação no local apropriado e, finalmente, teremos a organização das proteínas em suas conformações secundárias e terciárias para tornarem-se funcionais (NOLLEN & MORIMOTO, 2002; SHUKLA *et al*, 2004). Ações tão complexas são dependentes de um meio intracelular altamente regulado sob ponto de vista termodinâmico. Assim, um aspecto fundamental na fisiologia da célula é o controle da osmolaridade do citoplasma (SHUKLA *et al*, 2004; BURG *et al*, 2007). A osmolaridade da célula é

controlada pela ação de pequenas moléculas, chamadas de osmolitos, que não são permeáveis à membrana citoplasmática. É possível que o uso de soluções hipertônicas leve à desidratação aguda das células desencadeando alterações críticas no metabolismo celular que poderiam levar à disfunção ou, mesmo, à morte da célula.

A nossa análise relativa à medida da pressão arterial média nos diversos momentos do protocolo não mostrou alterações significativas entre os animais submetidos à isquemia seguida de reperfusão intestinal. A exclusão do território vascular irrigado pela artéria mesentérica superior não foi acompanhada de alterações significativas da pressão arterial média. No tempo cirúrgico oposto, a reperfusão desse território vascular, nós observamos uma pequena e transitória queda nos valores da pressão arterial média dos animais submetidos à isquemia. Em um estudo recente de CRUZ Jr e colaboradores (2006), cães foram submetidos à isquemia intestinal transitória e o registro da pressão arterial média mostrou padrão similar ao encontrado em nosso trabalho. Esses resultados são diferentes dos obtidos por KHANNA (2001) e colaboradores que utilizaram ratos da linhagem Sprague-Dawley. Esses autores relatam aumento transitório da pressão arterial média durante a oclusão da artéria mesentérica superior e diminuição mantida dos valores da pressão arterial após a reperfusão intestinal (KHANNA *et al*, 2001).

Existem diferenças relevantes entre o nosso estudo e o realizado por KHANNA e seus colaboradores (2001). Ratos da linhagem Sprague-Dawley parecem apresentar uma maior variabilidade em relação ao controle da pressão

arterial em comparação com ratos da linhagem Wistar (POLLOCK & REKITO, 1998; WAISMAN *et al*, 2005; CHEN *et al*, 2006). É relevante a observação que animais da mesma linhagem Sprague-Dawley quando são obtidos de diferentes criadores mostram uma reatividade vascular ao óxido nítrico diferente para cada fornecedor (POLLOCK & REKITO, 1998; WAISMAN *et al*, 2005; CHEN *et al*, 2006). Em nossos protocolo, a anestesia foi induzida com cloridrato de xylazina (5 mg/Kg de peso corporal *im*) associado ao pentobarbital (30 mg/Kg de peso corporal *ip*) e os animais foram mantidos sob anestesia geral com um hipnótico (pentobarbital) e uso de anestésico local quando apropriado. Após a reperfusão mesentérica e fechamento da cavidade abdominal, a anestesia foi suspensa. No estudo de KHANNA e seus colaboradores (2001), os autores utilizaram dois anestésicos sistêmicos em doses altas (cloridrato de xylazina 9mg/Kg de peso corporal *im* e ketamina 90 mg/Kg de peso corporal *im*) e mantiveram a anestesia durante todo o período de reperfusão (4 horas).

Os nossos dados são concordantes com a hipótese de que os ajustes hemodinâmicos que ocorrem na sequência da oclusão do território vascular da artéria mesentérica superior ocorrem quase imediatamente. Mostra também, que a manutenção da anestesia após a reperfusão do intestino pode modificar o curso dos ajustes hemodinâmicos. Nesse aspecto, a ação dos barorreceptores do arco aórtico e artérias carótidas é bastante comprometida com a manutenção da anestesia geral (LOHMEYER, 2001; GU *et al*, 2007). Alguns autores sugerem que o modelo de isquemia mesentérica seria equivalente aos modelos clássicos de hemorragia controlada descritos na literatura científica (KOZAR *et al*, 2004). Nossos resultados não corroboram essa opinião.

Devemos lembrar que a pressão arterial média não é monitorizada de maneira rotineira nos estudos experimentais de isquemia da artéria mesentérica superior. Alguns estudos (ver acima) utilizam ratos de linhagem diferente da Wistar e apresentam resultados relativos às variações de pressão arterial média diferente dos obtidos aqui. Lembramos que os aspectos metodológicos (protocolo de anestesia, tempo de isquemia, objetivo do estudo) são decisivos na análise dos resultados e, muitas vezes, podem acrescentar uma tendência nas conclusões do estudo.

A medida do débito cardíaco é o principal parâmetro para avaliar a eficácia de preenchimento do sistema circulatório e nos fornece uma aproximação do estado de perfusão tecidual. Entretanto, sob o ponto de vista metodológico, a avaliação do débito cardíaco nem sempre é possível. A pressão arterial média não reflete nenhum desses parâmetros e mostra alterações, somente, em situações de perda acentuada de volume circulante ou na falência do tônus vascular das artérias sistêmicas. Em nosso estudo, a medida da pressão arterial média serviu como parâmetro do nível de anestesia, para inferência da possibilidade de dor ou sofrimento e identificação de variações não esperadas e extremas do quadro clínico no modelo experimental.

A produção aumentada de espécies reativas de oxigênio ocorre nas situações de reperfusão em um tecido previamente isquêmico ou em condições de diminuição mantida da perfusão tecidual. O acúmulo de espécies reativas de oxigênio leva ao esgotamento dos sistemas celulares existentes para neutralização das mesmas. É o que se denomina de estresse oxidativo. Como foi discutido acima, a peroxidação lipídica é um dos principais mecanismos de lesão celular causados pelas espécies reativas de oxigênio. Neste trabalho, escolhemos medir a concentração de MDA nos tecidos para obtermos uma estimativa aproximada da intensidade do estresse

oxidativo imposto aos órgãos nas primeiras horas que seguiram a reperfusão intestinal.

Os resultados mostram que o pré-tratamento dos animais com a infusão de soluções cristalóides foi eficaz na diminuição do estresse oxidativo e, por inferência, na diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio. Essa resposta foi observada em órgãos esplâncnicos intra-abdominais (intestino, fígado) ou extra-abdominais (pulmões). Em todos os períodos do estudo, os valores do MDA dos animais que receberam infusão de solução cristalóide (grupos SH e SF) acompanharam os valores obtidos com os animais submetidos à isquemia falsa (grupo IF). Lembramos que cerca de 70% do metabolismo hepático é dependente do aporte de nutrientes via sistema porta. A isquemia da artéria mesentérica superior reduz, indiretamente, o fluxo sanguíneo no fígado (KISS *et al*, 2009). Entretanto, a diminuição do fluxo pela veia porta leva a um aumento compensatório do fluxo pela artéria hepática e, portanto, não ocorre um estado de “isquemia” do órgão durante a oclusão da artéria mesentérica superior (JAKOB, 2003).

Apesar dessa observação, nossos resultados demonstraram que o fígado foi submetido a um aumento da formação de espécies reativas de oxigênio após a reperfusão do território da artéria mesentérica superior que, como foi relatado acima, aparentemente não foi causado por isquemia do órgão.

Caracteristicamente, o grupo de animais que não foi submetido a tratamento (Grupo ST) apresentou concentrações elevadas de MDA no fígado em todos os períodos após a reperfusão. Essas diferenças alcançaram significância estatística com os animais tratados nos períodos de duas, quatro ou seis horas após a reperfusão.

Inclusive, nos animais sem tratamento as concentrações de MDA obtidas no tecido hepático mostraram-se superiores às medidas no intestino delgado que foi o órgão alvo da isquemia e reperfusão.

Além disso, as concentrações de MDA nos animais que receberam pré-tratamento apresentaram forte queda após as 4 horas iniciais da reperfusão, porém, os animais que não foram tratados mantiveram concentrações elevadas de MDA mesmo após seis horas de reperfusão. Esses resultados indicam a manutenção de um estado de estresse oxidativo no fígado que pode estar relacionado ao comprometimento da microcirculação do órgão. Consideramos a possibilidade de que o comprometimento da microcirculação hepática seja causado pela liberação de endotoxinas após a reperfusão do intestino. Essa hipótese é compatível com os dados obtidos a partir do pré-tratamento dos animais com soluções cristalóides que, melhorando a perfusão na microcirculação, poderiam amenizar a produção das espécies reativas de oxigênio.

É interessante observar que as variações de concentração de MDA no pulmão mostraram uma evolução temporal similar às obtidas para o fígado: aumento dos valores nas primeira quatro horas de reperfusão, declínio acentuado na análise de seis horas nos animais tratados e manutenção de valores elevados nos animais sem tratamento após seis horas da reperfusão. Entretanto, é importante ressaltar que os valores encontrados para o MDA no tecido pulmonar tenderam a ser, comparativamente, mais elevados do que os obtidos para os órgãos esplâncnicos.

A resposta inflamatória foi avaliada neste modelo segundo a análise da infiltração de neutrófilos ativados nos tecidos (intestino, fígado e pulmões), da produção local das interleucinas 6 e 10 e da concentração plasmática dessas duas

interleucinas. A infiltração de neutrófilos ativados nos tecidos foi avaliada pelo método químico da atividade da mieloperoxidase (MPO). A mieloperoxidase é uma enzima utilizada pelo neutrófilo para a produção de hipoclorito que é uma molécula que atua na lise da parede das bactérias. A evolução da atividade da MPO nos tecidos foi similar nos casos de isquemia falsa e nos animais tratados com as duas soluções cristalóides. Entretanto, em cada um dos órgãos estudados e em cada tempo após a reperfusão, os animais não tratados apresentaram níveis elevados de atividade da MPO tecidual que atingiram significância estatística na análise comparativa com os outros grupos. Além disso, os animais não tratados mostraram nível elevado persistente da atividade da MPO após seis horas da reperfusão.

Como foi citado anteriormente, a infiltração das células inflamatórias nos tecidos obedece a mecanismos de quimiotaxia que são desencadeados pela produção local das interleucinas (KALIA *et al*, 2003; DAVIDSON *et al*, 2004). Nesse trabalho, analisamos o curso temporal de duas interleucinas primordialmente associadas a mecanismos pró-inflamatórios (IL-6) ou anti-inflamatórios (IL-10). As concentrações de IL-6 foram muito próximas nos animais submetidos à isquemia falsa (IF) e nos animais pré-tratados com SH 7,5%. Animais que receberam pré-tratamento com solução SF 0,9% (SF) apresentaram, quatro horas após a reperfusão, níveis estatisticamente elevados de IL-6 no fígado e no intestino quando comparados aos grupos SH e IF, sendo estes valores semelhantes aos animais não tratados (grupo ST). As concentrações de IL-10 nos tecidos apresentaram padrão semelhante às concentrações de IL-6 com valores similares entre os grupos IF e SH. Também em relação às concentrações de IL-10 no fígado e intestino estavam elevadas no grupo SF quatro horas após reperfusão com valores semelhantes ao grupo ST.

Muitos estudos são direcionados para a identificação de substâncias que poderiam ser responsáveis pela disseminação de um processo inflamatório local. Nessa área, as interleucinas são as moléculas mais estudadas na inflamação sistêmica. Além disso, muitas pesquisas procuram as possíveis rotas para a disseminação de uma reação inflamatória inicialmente restrita a um órgão. Para o intestino, alguns estudos sustentam que o sistema linfático seria essa via de disseminação de uma eventual reação inflamatória (MAGNOTTI *et al*, 1998; HASSOUN *et al*, 2003; SAMBOL *et al*, 2008). Nossos resultados mostraram que as produções de IL-6 e IL-10 no fígado e intestino foram equivalentes nos animais tratados com SH 7,5% e no grupo IF, nas primeira 4 horas que seguiram a reperfusão intestinal. Os valores obtidos foram significativamente menores do que os obtidos para os grupos SF e ST. Portanto, esses dados sugerem uma ação inicial anti-inflamatória da SH 7,5% e identifica, também, a principal via de disseminação da resposta inflamatória como o sistema porta.

De uma maneira geral, as concentrações das interleucinas nos tecidos apresentaram padrão característico com as concentrações de IL-6 e IL-10 apresentando um aumento progressivo a partir das duas até as seis horas de reperfusão. Um resultado interessante foi obtido na análise das concentrações plasmáticas dessas interleucinas (estudadas com zero, duas e quatro horas após a reperfusão) em que os animais tratados com SH 7,5% apresentaram concentrações plasmáticas maiores quando comparadas com os outros grupos. Sabe-se que soluções hiperosmolares e/ou hipertônicas aumentam a permeabilidade vascular na microcirculação. Assim, a infusão prévia de SH 7,5% pode ter facilitado a passagem das interleucinas produzidas nos tecidos para a circulação sistêmica. Este fato

poderia estar relacionado à mortalidade animais tratados com solução hipertônica no período até quatro horas após a reperfusão, porem necessita de maiores estudos para melhor avaliação.

A reação inflamatória é iniciada pela sinalização do processo via moléculas de adesão, seguida pela infiltração local de leucócitos e modificada pela ação das interleucinas produzidas no tecido. Em tempos muito próximos ao desencadeamento do processo inflamatório, iniciam-se mecanismos que tendem a adequar a intensidade da reação à resolução do quadro. Dessa maneira, a produção de interleucinas pró-inflamatórias parece estar associadas à síntese das interleucinas anti-inflamatórias. Alguns estudos clínicos demonstraram que a síntese de IL-10 está relacionada à produção da IL-6 e que a proporção entre elas poderia correlacionar-se ao prognóstico da doença (TANIGUCHI *et al*, 1999). Os nossos resultados mostraram uma forte correlação entre as produções de IL-6 e IL-10 corroborando a hipótese discutida acima.

É interessante notar que a correlação é alta nos tecidos, contudo no plasma há uma moderada correlação. Este dado pode estar evidenciando que a solução hipertônica elevou mais a IL-10 do que a IL-6, não mantendo a proporcionalidade. Desta forma a solução hipertônica está promovendo um estado antiinflamatório que pode ser benéfico em proteger da isquemia mesentérica. Retornando aos dados em tecido a solução hipertônica reduziu os níveis de IL-6 no período de 4 horas comparado a salina. O que pode caracterizar novamente este efeito protetor e anti-inflamatório da solução hipertônica.

O uso da solução salina hipertônica 7,5% (SH 7,5%) passou a ser discutido intensamente após o estudo de VELASCO e colaboradores (1980). Esses autores mostraram a queda na taxa de mortalidade em cães submetidos a choque hemorrágico controlado e que foram tratados com pequenos volumes de SH 7,5%. Diversos trabalhos demonstraram que a SH 7,5% promove expansão do volume plasmático intravascular por aumento da pressão osmótica neste compartimento removendo a água principalmente do compartimento intracelular (CHIARA *et al*, 2003; SHIELDS *et al*, 2003; VICTORINO *et al*, 2003; KOLSEN-PETERSEN, 2004). A SH 7,5% também é inotrópica positiva aumentando a contratilidade do coração com consequente melhora do débito cardíaco. Na microcirculação a SH 7,5% melhora o fluxo sanguíneo devido à redução do volume das hemácias e das células endoteliais, associado à redução da resistência vascular periférica.

O aumento na concentração plasmática de sódio após injeção de SH 7,5% é relativamente fugaz, porém os efeitos da SH 7,5% permanecem por mais tempo (DROBIN & HAHN, 2002). Tal achado fez surgir trabalhos investigando possível ação imunológica e antiinflamatória da SH 7,5%. Em cultura de linfócitos observou-se um aumento na proliferação dos mesmos quando adicionado SH 7,5%. Também se observou que a SH 7,5% reverte a ação imunossupressora de Prostaglandina E2 (PGE2) em cultura de linfócitos T. Estes achados *in vitro* também foram observados em experimentos *in vivo*. No modelo de choque seguido de peritonite fecal houve redução da mortalidade nos animais tratados com SH 7,5%. Também foi observado que a SH 7,5% reduz a marginalização e adesão de neutrófilo, reduzindo a expressão de moléculas de adesão. No modelo de ligadura e punção cecal a SH 7,5% mostrou redução na translocação bacteriana e na formação de abscessos intra-abdominais.

(STEINBERG *et al*, 2005). Outra ação da SH 7,5% é o efeito anticoagulante, reduzindo formação de micro trombos que comprometeriam microcirculação (TAN *et al*, 2002).

Alguns efeitos adversos também são atribuídos a SH 7,5% . Desde o início de seu uso no choque hemorrágico é descrito aumento no risco de sangramento no modelo de choque não controlado pelo mecanismo de ação da SH 7,5% que poderia se sobrepor a mecanismos hemostáticos como vasoconstricção e tamponamento local e hipotensão. Tal achado não se confirmou em trabalhos clínicos e laboratoriais posteriores. Também são descritos com sintomas como fraqueza, irritabilidade e convulsão relacionados à hipernatremia com alterações no sistema nervoso central. Outro efeito adverso é a acidose hiperclorêmica induzida pelo aumento de cloro plasmático. Podem ocorrer hipotensão e arritmia cardíaca quando há infusão rápida da SH 7,5%.

Comparada ao tratamento convencional de choque hemorrágico com grandes volumes de solução salina isotônica, o uso de solução hipertônica de NaCl 7,5% em pequenos volumes minimiza o edema tecidual, direciona o fluxo de água livre para o espaço intravascular, melhorando os parâmetros hemodinâmicos e a perfusão tecidual, exacerba a resposta imune e reduz a resposta inflamatória (ATTUWAYBI *et al*, 2004; Chen *et al*, 2006; ROCH *et al*, 2008). O uso de NaCl 7,5% em soluções de colóide (dextran 70 ou Hidroxietilamido) aumenta as propriedades farmacológicas dessas soluções quando comparadas ao uso isolado da solução hipertônica de NaCl 7,5% (JONAS *et al*, 2000; GUSHCHIN *et al*, 2002; VICTORINO *et al*, 2003).

Concluimos que a expansão do volume intravascular com soluções cristalóides, imediatamente antes da reperfusão intestinal, foi eficaz para reduzir o impacto do estresse oxidativo e da resposta inflamatória tanto no território mesentérico quanto em outros órgãos. Observamos, também, que o uso da solução hipertônica de cloreto de sódio na concentração de 7,5% foi eficiente na atenuação dessas respostas em um volume de infusão oito vezes menor do que o utilizado para a solução salina isotônica. Como vimos ao longo deste texto, a isquemia intestinal é uma doença grave por si só e, muitas vezes, acomete pacientes em situação clínica crítica. Nessas situações, o uso de SH 7,5% em pequenos volumes de infusão poderia representar uma ótima opção terapêutica quando utilizada em períodos chaves do tratamento intensivo. A pesquisa experimental aplicada está associada ao conhecimento clínico e tem contribuído substancialmente para o entendimento da isquemia mesentérica. Creditamos, neste trabalho, algumas observações que parecem credenciar a SH 7,5% como agente terapêutico investigativo em futuros estudos em pacientes críticos.

Referências Bibliográficas

Ackland G, Grocott MP, Mythen MG. Understanding gastrointestinal perfusion in critical care: so near, and yet so far. *Crit Care*. 2000;5:269–81.

American College of Surgeons. Shock Chapter 3. In *Advanced Trauma Life Support Students Course Manual*, 7th ed. American College of Surgeons, pp. 79-116. Chicago IL. 2004.

Assalia A, Bitterman H, Hirsh M, Krausz MM. Influence of hypertonic saline on bacterial translocation in controlled hemorrhagic shock. *Shock*. 2001;15:307-11.

Attuwaybi B, Kozar RA, Gates KS, Moore-Olufemi S, Sato N, *et al.* Hypertonic saline prevents inflammation, injury, and impaired intestinal transit after gut ischemia/reperfusion by inducing heme oxygenase 1 enzyme. *J Trauma*. 2004a.;56:749-59.

Attuwaybi BO, Kozar RA, Moore-Olufemi SD, Sato N, Hassoun HT, *et al.* Heme oxygenase-1 induction by hemin protects against gut ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* . 2004b;118:53-7.

Bagshaw SM, Bellomo R. The influence of volume management on outcome. *Curr Opin Crit Care*. 2007;13:541–8.

Baumgart DC, Dignass AU. Intestinal barrier function. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2002; 5:685-94.

- Bedard K, Krause K-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87:245-313.
- Boros M, Bako L, Nagy S. Effect of antioxidant therapy on cyclooxygenase-derived eicosanoid release during intestinal ischemia/reperfusion. *Eur Surg Res.* 1991;23:141-50.
- Bowles MJ, Pockley AG, Wood RFM. Effect of anti-CD4 monoclonal antibody administration on rat small bowel allograft survival and circulating leukocyte populations. *Transpl Int.* 2000;13:211-7.
- Bradford MM. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
- Brandt LJ, Boley SJ. AGA Technical Review on Intestinal Ischemia. *Gastroenterology.* 2000; 118:954-68.
- Burg MB, Ferraris JD, Dmitrieva NI. Cellular Response to Hyperosmotic Stresses. *Physiol Rev.* 2007; 87:1441-74.
- Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 2000;190:255-66.
- Cavriani G, Oliveira-Filho RM, Trezena AG, da Silva ZL, Domingos HV, *et al.* Lung microvascular permeability and neutrophil recruitment are differently regulated by nitric oxide in a rat model of intestinal ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol.* 2004;494:241-9.

- Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. Fisiopatologia da isquemia e reperfusão mesentérica: revisão. *Acta Cirúrgica Brasileira*. 2005;20:336-46.
- Chang JX, Chen S, Ma LP, Jiang LY, Chen JW, Chang RM, Wen LQ, Wu W, Jiang ZP, Huang ZT. Functional and morphological changes of the gut barrier during the restitution process after hemorrhagic shock. *World Journal of Gastroenterology*. 2005;11:5485-91.
- Chen CF, F.J. L, Chen HI, Wang D, Chou SJ. Ischemia/Reperfusion-Induced Low Reactivity of the Rat Superior Mesenteric Vascular Bed is Associated with Expression of Nitric Oxide Synthases. *Transplantation Proceedings*. 2006;38:2216-20.
- Chen LW, Huang HL, Lee IT, Hsu CM, Lu PJ. Hypertonic saline enhances host defense to bacterial challenge by augmenting Toll-like receptors. *Crit Care Med*. 2006;34(6):1758–68.
- Chiara O, Pelosi P, Brazzi L, Bottino N, Taccone P, *et al*. Resuscitation from hemorrhagic shock: experimental model comparing normal saline, dextran, and hypertonic saline solutions. *Crit Care Med*. 2003;31:1915-22.
- Choi P, Yip G, Quinonez L, Cook DJ. Crystalloids vs. colloids in fluid resuscitation: A systematic review. *Crit Care Med*. 1999;27:200-10.
- Cong D, Doherty M, Pang KS. A New Physiologically Based, Segregated-Flow Model to Explain Route dependent Intestinal Metabolism. *Drug Metabolism and Disposition*. 2000;28:224-235.
- Cruz Jr RJ, Correia C, Poli-de-Figueiredo L, Rocha-e-Silva M. Avaliação inicial dos gradientes sistêmicos e regionais da pCO₂ como marcadores de hipoperfusão mesentérica. *Arquivos de Gastroenterologia*. 2006;43:59-65.

- Cruz Jr RJ, Garrido AG, Ribeiro CMF, Harada T, Rocha-e-Silva M. Regional Blood Flow Distribution and Oxygen Metabolism During Mesenteric Ischemia and Congestion. .2009;*In press*.
- Cuddihy S, Parker A, Harwood D, Vissers M, Winterbourn C. Ascorbate interacts with reduced glutathione to scavenge phenoxyl radicals in HL60 cells. *Free Radic Biol Med*. 2008;44:1637-44.
- Davidson M, Deitch E, Lu Q, Osband A, Feketeova E, *et al*. A study of the biologic activity of trauma-hemorrhagic shock mesenteric lymph over time and the relative role of cytokines. *Surgir*. 2004; 136:32-41.
- De Paola R, Muià C, Mazzon E, Genovese T, Crisafulli C, *et al*. Effects of Hypericum Perforatum Extract in a Rat Model of Ischemia and Reperfusion Injury. *Shock*. 2005;24:255-63.
- Drobin D, Hahn RG. Kinetics of Isotonic and Hypertonic Plasma Volume Expanders. *Anesthesiology*. 2002;96:1371–80.
- Farber A, Connors JP, Friedlander RM, Wagner RJ, Richard J. Powell M, Cronenwett JL.. A specific inhibitor of apoptosis decreases tissue injury after intestinal ischemia/reperfusion in mice. *Journal of Vascular Surgery* 1999;30:752-60.
- Frojse R, Lehtipalo S, Winso O, Johansson G, Biber B, Arnerlov C. Assessment of Graded Intestinal Hypoperfusion and Reperfusion Using Continuous Saline Tonometry in a Porcine Model. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2004;28:79-88.
- Goldblum SE, Wu KM, Jay M. Lung myeloperoxidase as a measure of pulmonary leukostasis in rabbits. *J Appl Physiol*. 1985;59(6):1978-85.

- Gonzalez EA, Kozar RA, Suliburk JW, Weisbrodt NW, Mercer DW, Moore FA. Hypertonic Saline Resuscitation After Mesenteric Ischemia/Reperfusion Induces Ileal Apoptosis. *J Trauma*. 2005;59:1092–8.
- Gonzalez EA, Kozar RA, Suliburk JW, Weisbrodt NW, Mercer DW, Moore FA. Conventional Dose Hypertonic Saline Provides Optimal Gut Protection and Limits Remote Organ Injury After Gut Ischemia Reperfusion. *J Trauma*. 2006;61:66–74.
- Grotz MRW, Ding J, Guo W, Huang Q, Deitch EA. Comparison of Plasma Cytokine Levels in Rats Subjected to Superior Mesenteric Artery Occlusion or Hemorrhagic Shock. *Shock*. 1995;3:362-8.
- Grotz MRW, Deitch EA, Ding J, Xu D, Huang Q, Regel G. Intestinal Cytokine Response After Gut Ischemia. Role of Gut Barrier Failure. *Annals of Surgery*. 1999;229:478-86.
- Gtinel E, Catilayan F, Caglayan O, Dilsiz A, Duman S, Aktan M. Treatment of Intestinal Reperfusion Injury Using Antioxidative Agents. *J Pediatr Surg*. 1998;33:1536-9.
- Gu H, Lin M, Liu J, Gozal D, Scrogin K, Wurster R, et al. Selective impairment of central mediation of baroreflex in anesthetized young adult Fischer 344 rats after chronic intermittent hypoxia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007;293(5):2809-18.
- Gushchin V, Stegalkina S, Alam HB, Kirkpatrick JR, Rhee PM, Koustova E. Cytokine Expression Profiling in Human Leukocytes after Exposure to Hypertonic and Isotonic Fluids. *J Trauma*. 2002;52:867-71.

Guyton AC, Hall JE. *Tratado de Fisiologia Médica*, 10^aed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S A; 2002. pp. 702-11

Haglund E, Haljamäe H. Failure of hypertonic saline to resuscitate intestinal ischemia shock in the rat. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1992;36:410-8.

Haglund U. Gut ischaemia. *Gut* . 1994; Suppl 1:S73-S76

Hassoun HT, Fischer UM, Attuwaybi BO, Moore FA, Safi HJ, *et al*. Regional Hypothermia Reduces Mucosal NF- κ B and PMN Priming via Gut Lymph During Canine Mesenteric Ischemia/Reperfusion. *Journal of Surgical Research*. 2003;115:121-6.

Hatoum OA, Binion DG. The Vasculature and Inflammatory Bowel Disease Contribution to Pathogenesis and Clinical Pathology. *Inflamm Bowel Dis*. 2005;11:304–13.

Hirsch AT, Haskal ZJ, Hertzner NR, Bakal CW, Creager MA, *et al*. ACC/AHA 2005 Guidelines for the Management of Patients With Peripheral Arterial Disease (Lower Extremity, Renal, Mesenteric, and Abdominal Aortic): Executive Summary *Journal of the American College of Cardiology*. 2006;47:1239–312.

Huang PP, Stucky FS, Dimick AR, Dimick AR, Treat R C, Bessey PQ, Rue LW. Hypertonic sodium resuscitation is associated with renal failure and death. *Ann Surg*. 1995;221:543–554.

Jakob SM. Clinical review: Splanchnic ischaemia. *Critical Care*. 2002;6:306-12.

Jakob SM. Splanchnic Blood Flow in Low-Flow States. *Anesth Analg*. 2003;96:1129-38.

- Janero D. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med*. 1990;9:515-40.
- Järvelä K, Koskinen M, Kööbi T. Effects of hypertonic saline (7.5%) on extracellular fluid volumes in healthy volunteers. *Anaesthesia*. 2003;58:878-81.
- Jonas J, Heimann A, Strecker U, Kempfski O. Hypertonic/Hyperoncotic Resuscitation After Intestinal Superior Mesenteric Artery Occlusion: Early Effects on Circulation and Intestinal Reperfusion. *Shock*. 2000;14:24-9.
- Kalia N, Brown NJ, Wood RF, Hopkinson K, Fairburn B, Pockley AG. Effects of intestinal ischemia-reperfusion injury on rat peripheral blood neutrophil activation. *Dig Dis Sci*. 2003;48:1677-84.
- Kalia N, Brown NJ, Wood RFM, Pockley AG. Ketotifen abrogates local and systemic consequences of rat intestinal ischemia-reperfusion injury. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2005;20:1032-8.
- Khanna A, Rossman JE, Fung HL, Caty MG. Intestinal and hemodynamic impairment following mesenteric ischemia/reperfusion. *J Surg Res*. 2001;99:114-9.
- Kiss J, Naum A, Kudomi N, Knuuti J, Iozzo P, *et al*. Non-invasive diagnosis of acute mesenteric ischaemia using PET. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2009 Mar 11 In Press-DOI 10.1007/s00259-009-1094-0.
- Koike K, Yamamoto Y, Hori Y, Ono T. Group IIA Phospholipase A2 Mediates Lung Injury in Intestinal Ischemia-Reperfusion. *Annals of Surgery*. 2000;232:90-7.

- Kolsen-Petersen JA. Immune effect of hypertonic saline: fact or fiction? *Acta Anaesthesiol Scand*. 2004;48:667-78.
- Kougias P, Lau D, Sayed HFE, Zhou W, Huynh TT, Lin PH. Determinants of mortality and treatment outcome following surgical interventions for acute mesenteric ischemia. *J Vasc Surg*. 2007;46:467-74.
- Kozar RA, Holcomb JB, Hassoun HT, Macaitis J, DeSoignie R, Moore FA. Superior mesenteric artery occlusion models shock-induced gut ischemia-reperfusion. *J Surg Res*. 2004;116:145-50.
- Krausz M. Controversies in shock research: hypertonic resuscitation-pros and cons. *Shock*. 1995;3:69-72.
- Lammers KM, Innocenti G, Venturi A, Rizzello F, Helwig U, Campieri M, Bianchi GP, Pedrini L, Di Nino G, Gionchetti P. The effect of transient intestinal ischemia on inflammatory parameters. *Int J Colorectal Dis*. 2003;18:78-85.
- Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;282:227-41.
- Liu K, Chen S, Huang W, Li Y, Irwin M, Xia Z. Propofol pretreatment reduces ceramide production and attenuates intestinal mucosal apoptosis induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats. *Anesth Analg*. 2008;107:1884-1891.
- Lock G. Acute intestinal ischaemia. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*. 2001;15:83-98.
- Lohmeier T. The sympathetic nervous system and long-term blood pressure regulation. *Am J Hypertens*. 2001;14(6 Pt 2):147S-54S

- Maataoui A, Reusch E, Khan M, Gurung J, Thalhammer A, *et al.* Comparison of analog and digital fluoroscopy devices regarding patient radiation exposure in enteroclysis. *Rofo*. 2008;180:246-5.
- Magnotti LJ, Upperman JS, Xu D-Z, Lu Q, Deitch EA. Gut-Derived Mesenteric Lymph but not Portal Blood Increases Endothelial Cell Permeability and Promotes Lung Injury After Hemorrhagic Shock. *Annals of Surgery*. 1998;228:518-27.
- Meyer-Lindenberg A, C E, Wolvekamp P, Tellhelm B, Meutstege F, *et al.* Comparative evaluation of six different body regions of the dog using analog and digital radiography. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*. 2008;121:216-27.
- Murayama T, Tanabe M, Matsuda S, Shimazu M, Kamei S, Wakabayashi G, Kawachi S, Matsumoto K, Yamazaki K, Matsumoto K, Koyasu S, Kitajima M. JNK (c-Jun NH2 Terminal Kinase) and p38 during Ischemia Reperfusion Injury in the Small Intestine. *Transplantation Proceedings*. 2006;81:1325–30
- Nagira M, Tomita M, Mizuno S, Kumata M, Ayabe T, Hayashi M. Ischemia/Reperfusion Injury in the Monolayers of Human Intestinal Epithelial Cell Line Caco-2 and its Recovery by Antioxidants. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2006;21:230-7
- 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*. 2004;34:937-42.
- Nezu Y, Shigihara K, Harada Y, Yogo T, Hara Y, Tagawa M. Effects of small intestinal ischemia and reperfusion on expression of tumor necrosis factor- α and interleukin-6 messenger RNAs in the jejunum, liver, and lungs of dogs.. In *Am J Vet Res*. 2008;69:512-8.

- Nieuwenhuijzen GA, Goris RJ. The gut: the 'motor' of multiple organ dysfunction syndrome? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 1999;2:399-404.
- Nollen EAA, Morimoto RI. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins. *Journal of Cell Science*. 2002;115:2809-16.
- Nordberg J, Arnér ESJ. Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. *Free Radical Biology & Medicine*. 2001;31:1287-312.
- Oldenburg WA, Lau LL, Rodenberg TJ, Edmonds HJ, Burger CD. Acute mesenteric ischemia: a clinical review. *Arch Intern Med*. 2004;164:1054-62
- Oliveira RP, Velasco I, Soriano FG, Friedman G. Hypertonic saline resuscitation in sepsis. *Critical Care* . 2002;6:418-23
- Panés J, Piqué JM. Intestinal Ischemia. In Yamada T. *Textbook of Gastroenterology* 4th ed. Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. Disponível em: <http://ovidsp.tx.ovid.com>.
- Pollock DM, Rekito A. Hypertensive response to chronic NO synthase inhibition is different in Sprague-Dawley rats from two suppliers. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*. 1998;275:1719-23.
- Quaedackers JSLT, Beuk RJ, Bennet L, Charlton A, oudeEgbrink MGA, Gunn AJ, Heineman E. An Evaluation of Methods for Grading Histologic Injury Following Ischemia/Reperfusion of the Small Bowel. *Transplantation Proceedings* . 2000;32:1307-10.
- Rabinovici R, Yue T, Krausz M, Sellers T, Lynch K, Feuerstein G. Hemodynamic, hematologic and eicosanoid mediated mechanisms in 7.5 percent sodium

chloride treatment of uncontrolled hemorrhagic shock. *Surgery, Gynecology and Obstetrics* . 1992;175:341-54.

Raybould HE, Pandol SJ, Yee H. The Integrated Responses of the Gastrointestinal Tract and Liver to a Meal. In Yamada T. *Textbook of Gastroenterology* 4th ed. Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams & Wilkins; 2003. *Chapter 1*. Disponível em: <http://ovidsp.tx.ovid.com>

Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, *et al*. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* . 2001;345:1368-77

Roch A, Castanier M, Mardelle V, Trousse D, Marin V, *et al*. Effect of hypertonic saline pre-treatment on ischemia-reperfusion lung injury in pig. *J Heart Lung Transplant*. 2008;27:1023-30

Rocha-e-Silva M, Figueiredo LFP. Small volume hypertonic resuscitation of circulatory shock. *Clinics* . 2005;60:159-72.

Rosenblum JD, Boyle CM, Schwartz LB. The Mesenteric Circulation, Anatomy and Physiology. *Surgical Clinics of North America* . 1997;77:289-306.

Sambol JT, Lee MA, Caputo FJ, Kawai K, Badami C, *et al*. Mesenteric lymph duct ligation prevents trauma/hemorrhage shock-induced cardiac contractile dysfunction. *J Appl Physiol*. 2008;November 13:Article in Press.

Sasaki M, Joh T. Oxidative Stress and Ischemia-Reperfusion Injury in Gastrointestinal Tract and Antioxidant, Protective Agents. *J. Clin. Biochem. Nutr* . 2007;40:1-12.

Schneider T, Longo W, Ure T, Vernava AI. Mesenteric Ischemia Acute Arterial Syndromes. *Dis Colon Rectum* 1994;37:1163-74.

Schoenberg M, Beger H. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* . 1993;21:1376-86.

Schoots IG, Levi M, Roossink P, Bijlsma PB, van Gulik TM. Local intravascular coagulation and fibrin deposition on intestinal ischemia-reperfusion in rats. *Surgery*. 2003;133:411-9

Schwarz NT, Beer-Stolz D, Simmons RL, Bauer AJ. Pathogenesis of Paralytic Ileus Intestinal Manipulation Opens a Transient Pathway Between the Intestinal Lumen and the Leukocytic Infiltrate of the Jejunal Muscularis. *Annals of Surgery*. 2002;235:31-40.

Shields CJ, Winter DC, Manning BJ, Wang JH, Kirwan WO, Redmond HP. Hypertonic saline solution infusion for pulmonary injury due to ischemia reperfusion *Arch Surg* . 2003;138:9-14.

Shukla A, Hashiguchi N, Chen Y, Coimbra R, Hoyt DB, Junger WG. Osmotic regulation of cell function and possible clinical applications. *Shock* . 2004;21:391-400.

Simeone DM. Anatomy and Physiology of the Small Intestine. In Greenfield LJ, Mulholland M W, Lillemoe KD, Doherty GM, Maier RV, Upchurch GR. *Greenfield's Surgery: Scientific Principles and Practice*. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins. 2006. Chapter 49. Disponível em: www.ovid.com.

Souza HP, Cardounelc AJ, Zweierc JL. Mechanisms of free radical production in the vascular wall. *Coronary Artery Disease* . 2003;14:101-7.

Stallion A, Kou TD, Latifi SQ, Miller KA, Dahms BB, Dudgeon DL, Levine AD. Ischemia/reperfusion: a clinically relevant model of intestinal injury yielding systemic inflammation. *Journal of Pediatric Surgery* . 2005;40:470–7.

Steinberg J, Halter J, Schiller H, Gatto L, Nieman G. The Development of Acute Respiratory Distress Syndrome after Gut Ischemia/Reperfusion Injury Followed by Fecal Peritonitis in Pigs: A Clinically Relevant Model. *Shock* . 2005;23:129-37.

Suzuki K, Otake M, Saida Y, Koie H, Asano R. The Effect of 7.2% Hypertonic Saline Solution with 6% Dextran 70 on Cardiac Contractility as Observed by an Echocardiography in Normovolemic and Anesthetized Dogs. *J. Vet. Med. Sci.* 2008a; 70:89-94.

Suzuki T, Yamashita K, Jomen W, Ueki S, Aoyagi T, *et al.* The Novel NF-B Inhibitor, Dehydroxymethylepoxyquinomicin, Prevents Local and Remote Organ Injury Following Intestinal Ischemia/Reperfusion in Rats. *Journal of Surgical Research* . 2008b;149:69-75.

Tan TS, Tan KHS, Ng HP, Loh MW. The effects of hypertonic saline solution (7.5%) on coagulation and fibrinolysis: an in vitro assessment using thromboelastography. *Anaesthesia*. 2002;57:644-8.

Taniguchi T, Koido Y, Aiboshi J, Yamashita T, Suzaki S, Kurokawa A. Change in the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts a poor outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Critical Care Medicine* . 1999;27:1262-4.

Tekin I, Sipahi E, Mustafa C, Acikgoz S, Yurdakan G. Low-Density Lipoproteins Oxidized After Intestinal Ischemia/Reperfusion in Rats. *Journal of Surgical Research*. 2008;Dec6:(In Press).

Terada LS. Oxidative stress and endothelial activation. *Crit Care Med.* 2002; 30(Suppl 5): S186 –S191.

Thomas S, Karnik S, Balasubramanian KA. Surgical Manipulation of the Small Intestine and Its Effect on the Lung. *Journal of Surgical Research*; . 2002;106:145–56.

Tølløfsrud S, Elgjo GI, Prough DS, Williams CA, Traber DL, George C, Kramer P. The Dynamics of Vascular Volume and Fluid Shifts of Lactated Ringer's Solution and Hypertonic-Saline-Dextran Solutions Infused in Normovolemic Sheep. *Anesth Analg.* 2001;93:823-31.

Velasco IT, Pontieri V, Rocha e Silva M, Lopes OU. Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *Am J Physiol.* 1980;239:H664-73.

Victorino G, Newton C, Curran B. The effect of tonicity and hypertonic solutions on microvascular permeability. *J Surg Res.* 2002;104:101-5.

Victorino GP, Newton CR, Brian Curran BS. Effect of Hypertonic Saline on Microvascular Permeability in the Activated Endothelium. *Journal of Surgical Research.* 2003;112:79-83.

Waisman D, Brod V, Dickstein R, Abramovich A, Rotschild A. Effects of Inhaled Nitric Oxide on Lung Injury After Intestinal Ischemia-Reperfusion in Rats. *Shock* . 2005;23:150-5.

Weigand MA, Hörner C, Bardenheuer HJ, Bouchon A. The systemic inflammatory response syndrome. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology.* 2004;18(3):455-75

White BC, Sullivan JM, DeGracia DJ, O'Neil BJ, Neumar RW, *et al.* Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of the Neurological Sciences*. 2000;179:1-33.

Wyers MC, Powell RJ, Nolan BW, Cronenwett JL. Retrograde mesenteric stenting during laparotomy for acute occlusive mesenteric ischemia. *J Vasc Surg*. 2007;45:269-75.

Yasuhara H. Acute Mesenteric Ischemia: The Challenge of Gastroenterology. *Surg Today*. 2005;35:185-95.

Ypsilantis P, Tentes I, Lambropoulou M, Anagnostopoulos K, Papadopoulos N, Kortsaris A, Simopoulos C. Prophylaxis with mesna prevents oxidative stress induced by ischemia reperfusion in the intestine via inhibition of nuclear factor-kB activation. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2008;23:328-35.

Zakaria ER, Garrison NLTRN. Hypertonic saline resuscitation improves intestinal microcirculation in a rat model of hemorrhagic shock. *Surgery*. 2006;140:579-88.