

ERON FÁBIO MIRANDA

**A INFLUÊNCIA DO AZUL DE METILENO NA CICATRIZAÇÃO DE
ANASTOMOSES INTESTINAIS SUBMETIDAS À ISQUEMIA E
REPERFUSÃO**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da
Pontifícia Universidade Católica do
Paraná, como requisito parcial para a
obtenção do título de Mestre em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Hintz Greca

Coordenador: Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bahten

**CURITIBA
2006**

A verdadeira ciência descobre Deus
à espera atrás de cada porta.

Papa Pio XII

Miranda, Eron Fábio

A influência do azul de metileno nas anastomoses intestinais submetidas à isquemia e reperfusão / Eron Fábio Miranda. – Curitiba, 2006.

xi, 76f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Hintz Greca.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

1.Cicatrização de feridas. 2.Isquemia intestinal. 3.Reperfusão.
4.Azul de metileno. I.Título.

NLM WI 400

Aos meus pais maravilhosos, Liége e Renato, pelo exemplo de humildade e perseverança. Fica a lição de que nada na vida se conquista sem o devido sacrifício.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Von Bahten, pela oportunidade de estar entre o grupo de mestrandos do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Agradeço o exemplo profissional e pessoal na época da residência em Cirurgia Geral, o qual foi fundamental para minha formação.

Ao Prof. Dr. Fernando Hintz Greca, pela oportunidade concedida de atuar na linha de pesquisa de um profissional tão respeitado nacional e internacionalmente.

Ao Prof. Dr. João Carlos Repka, pela maneira contagiante de transmitir conhecimento na pesquisa científica. Minha sincera gratidão à sua dedicação nas oportunidades em que atuamos juntos.

À Prof.^a Dr.^a Maria Cristina Sartor, pelos conhecimentos a mim transmitidos na vida acadêmica e pela preocupação com a minha colocação profissional, concedendo-me a honra de hoje sermos colegas de trabalho e grandes amigos.

Ao Prof. Dr. Renato Araújo Bonardi, a quem agradeço o primeiro contato e o despertar do interesse pela coloproctologia. Agradeço por toda a sua dedicação com respeito à minha formação durante a residência médica. Sua postura e conhecimento como professor e médico servirão de exemplo para toda a minha vida.

Ao Prof. Dr. Zacarias Alves de Souza Filho, pelo exemplo de honestidade, decência profissional e seriedade. Minha grande admiração.

Ao Prof. Dr. Iwan Augusto Colaço, pelo exemplo de dedicação à formação dos seus residentes e da humanidade ao tratar os pacientes.

Aos Médicos do Hospital Universitário Cajuru, pela diversidade de conhecimentos a mim transmitidos.

Aos Médicos do Hospital Erasto Gaertner, pela rigorosa e eficiente orientação profissional e acadêmica.

À Prof.^a Dr.^a Lúcia Noronha pela sua valiosa ajuda na histologia e sugestões pertinentes.

Ao Dr. Luiz Roberto Kotze, pelo apoio na leitura das lâminas de histologia.

Ao Acadêmico de medicina Michel Risnic Rubin, pelo valoroso auxílio na extenuante fase experimental do trabalho.

À Prof.^a Márcia Olandoski pela disponibilidade e competência na realização do estudo estatístico.

Ao Dr. Norton Luiz Nóbrega, colega de profissão e amigo, exemplo de honestidade e dedicação ao próximo, por toda ajuda, cumplicidade e incentivo.

Ao Dr. Fábio Henrique de Carvalho, pela seriedade e competência profissional.

Aos Funcionários da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná: Sra. Rosana Nunes Ferreira, Sr. Álvaro Roberto Gonçalves Machado, Sr. Daniel Fidler e Sr. Misael Barbosa. Agradeço por toda a presteza, experiência e paciência a mim dedicados. Meu sincero respeito.

Aos Funcionários da Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em especial à Farmacêutica Ana Paula Camargo Martins e à Estagiária Milena Covalezuk.

Ao Dr. Indalécio Mainardes Sutil, médico veterinário responsável pelo Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, por toda a ajuda na obtenção dos animais de experimentação e pelos cuidados dedicados aos mesmos.

À Prof. Orésia Gérios por sua ajuda na correção ortográfica e pelas orientações na compreensão da língua portuguesa.

À Bibliotecária Aurea Maria Costin pela presteza na verificação das normas adotadas neste estudo.

Às pessoas com quem convivi durante este período, pela paciência e compreensão a mim dedicadas nos momentos de estresse e de ausência.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 OBJETIVO.....	05
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	06
2.1 CICATRIZAÇÃO GASTROINTESTINAL.....	07
2.2 MECANISMOS DE LESÃO PELA ISQUEMIA-REPERFUSÃO.....	09
2.3 ANASTOMOSES INTESTINAIS E ISQUEMIA-REPERFUSÃO.....	13
2.4 ESTRATÉGIAS PROTETORAS CONTRA OS DANOS DECORRENTES DA ISQUEMIA-REPERFUSÃO INTESTINAL.....	15
2.5 AZUL DE METILENO.....	18
3 MÉTODOS.....	22
3.1 ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO.....	23
3.1.1 Caracterização da Amostra.....	23
3.1.2 Ambiente de Experimentação.....	23
3.1.3 Organização dos Grupos de Estudo.....	24
3.1.4 Anestesia.....	24
3.1.5 Preparo da Pele e Posicionamento da Mesa.....	24
3.1.6 Laparotomia.....	24
3.1.7 Procedimento.....	25
3.1.8 Laparorrafia.....	25
3.1.9 Pós-operatório.....	26
3.1.10 Eutanásia.....	26
3.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....	27
3.2.1 Anastomoses Intestinais.....	27
3.2.2 Estudo Tensiométrico.....	27
3.3 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA.....	28
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	29
4 RESULTADOS.....	30
4.1 O MODELO ANIMAL.....	31
4.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA.....	31
4.3 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA.....	34
4.3.1 Avaliação da inflamação.....	34
4.3.1.1 Células polimorfonucleares.....	38
4.3.1.2 Edema.....	39
4.3.1.3 Congestão vascular.....	40
4.3.1.4 Células monomorfonucleares.....	41
4.3.1.5 Tecido da granulação.....	42
4.3.1.6 Fibrose.....	43
4.3.2 Avaliação do colágeno.....	45
5 DISCUSSÃO.....	48
6 CONCLUSÕES.....	55
7 REFERÊNCIAS.....	57
NORMAS ADOTADAS.....	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Variáveis usadas para estabelecer o escore final quanto à inflamação.....	28, 34
Quadro 2- Avaliação macroscópica nos grupos de estudo	32
Quadro 3- Resultados dos testes aplicados na comparação entre os grupos-avaliação macroscópica.....	33
Quadro 4- Análise dos parâmetros inflamatórios com seus respectivos escores nos grupos de estudo.....	35
Quadro 5- Valores médios e análise estatística dos parâmetros inflamatórios para os grupos de estudo.....	35
Quadro 6- Avaliação microscópica nos grupos de estudo-análise da inflamação.....	44
Quadro 7- Estatística descritiva do colágeno dos grupos em estudo.....	46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Aspecto das alças intestinais após injeção de azul de metileno e desclameamento.....	26
Figura 2- Fotomicrografia da área de anastomoses com coloração pela hematoxilina-eosina (x-40).....	36
Figura 3- Representação gráfica dos valores médios dos parâmetros inflamatórios para os grupos de estudo.....	37
Figura 4- Representação gráfica do escore das células polimorfonucleares nos grupos de estudo.....	38
Figura 5- Representação gráfica do escore do edema nos grupos de estudo.....	39
Figura 6- Representação gráfica do escore de congestão vascular nos grupos de estudo.....	40
Figura 7- Representação gráfica do escore das células monomorfonucleares nos grupos de estudo.....	41
Figura 8- Representação gráfica do escore de tecido de granulação nos grupos de estudo.....	42
Figura 9- Representação gráfica do escore de fibrose nos grupos de estudo.....	43
Figura 10- Representação gráfica do escore do colágeno Tipo I nos grupos de estudo.....	45
Figura 11- Representação gráfica do escore do colágeno Tipo III nos grupos de estudo.....	45
Figura 12- Fotomicrografia da área de anastomoses de animal do grupo azul de metileno (picrus sirius x200).....	47

RESUMO

Introdução: A isquemia intestinal é uma das mais sérias alterações intra-abdominais, com morbidade e mortalidade extremamente elevadas. A reoxigenação dos tecidos isquêmicos, fundamental para o reparo tecidual, produz eventos inflamatórios deletérios, com conseqüências mais sérias que a isquemia propriamente dita. O azul de metileno, pela sua ação como inibidor da formação de radicais livres, poderia interferir favoravelmente no processo de cicatrização.

Objetivo: Avaliar experimentalmente a influência do azul de metileno nas anastomoses intestinais de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. **Métodos:** Utilizaram-se 45 ratos Wistar, machos, divididos em 3 grupos: controle, grupo isquemia sem o uso de azul de metileno e grupo isquemia com o uso de azul de metileno. Foram submetidos a laparotomia, com identificação e isolamento da artéria mesentérica cranial. Nos animais do grupo controle foi realizada enterotomia e anastomose intestinal sem nenhuma lesão prévia, enquanto nos grupos 2 e 3 ocorreu oclusão temporária, segmentar da artéria mesentérica cranial pelo tempo de 45 minutos. Passado tal período, foram instilados na cavidade peritoneal 2ml de azul de metileno a 0,5% estéril no grupo 2 e 2ml de solução salina isotônica estéril no grupo 3. Após a reperfusão, foi realizada enterotomia e anastomose intestinal, como no grupo controle. Realizou-se a eutanásia no 7.º dia de pós-operatório, com anotações sobre alterações na cavidade abdominal e aferição das aderências perianastomóticas. A área da anastomose foi então ressecada para tomada de pressão de ruptura e estudo histopatológico. **Resultados:** Houve um óbito no grupo controle e seis óbitos nos grupos experimento. Devido ao grande número de aderência perianastomóticas, a tomada da pressão de ruptura só foi possível num número reduzido de casos. A presença de líquido livre ou abscesso na cavidade peritoneal foi raramente observada. Na avaliação da inflamação, entre os três grupos, o da isquemia sem o uso do azul de metileno apresentou escore mais elevado para as células mononucleares ($p=0,021$) e tecido de granulação ($p=0,044$), em relação ao grupo controle e ao da isquemia com o uso do azul de metileno. Na comparação dos níveis de colágeno Tipo I e III não houve diferença significativa. **Conclusão:** Observou-se maior frequência de aderências perianastomóticas nos ratos submetidos à isquemia e ao uso do azul de metileno. Em relação aos parâmetros analisados, não foi possível afirmar efeito benéfico do azul de metileno na cicatrização das anastomoses intestinais submetidas à isquemia e reperfusão..

DESCRITORES: 1.Cicatrização de Feridas. 2.Isquemia Intestinal. 3.Reperfusão
4.Azul de Metileno.

ABSTRACT

Introduction: Intestinal ischemia is one of the most serious intra-abdominal alterations and reflects extremely elevated morbidity and mortality. Re-oxygenation of the ischemic tissue, fundamental in tissue repair, produces deleterious inflammatory events with consequences even more severe than the ischemia itself. Methylene blue, due to its action as an inhibitor of free-radical formation, can favorably interfere in the scarring process. **Objective:** To experimentally evaluate the influence of methylene blue in the intestinal anastomoses of rats after ischemia and reperfusion. **Methods:** We utilized 45 male Wistar rats, divided into 3 groups: control, ischemia group without the use of methylene blue, and the ischemia group using methylene blue. The rats underwent laparotomy, identifying and isolating the mesenteric cranial artery. The animals in the control group underwent enterotomy and intestinal anastomoses with no prior lesion, while those in groups 2 and 3 underwent temporary occlusion and segmenting of the cranial mesenteric artery for 45 minutes. After this period, 2 ml of sterile methylene blue at 0.5% were injected into the peritoneal cavity of the rats in groups 2. In group 3, 2 ml of sterile isotonic saline solution were instilled. After reperfusion, enterotomy and intestinal anastomoses were performed as in the control group. On the seventh day alterations in the abdominal cavity were noted, perianastomotic adhesences were verified, and the animals were subsequently sacrificed. The area of anastomoses was then resected to measure rupture pressure and for histopathological study. **Results:** There was one death in the control group and six in the experimental groups. Due to the great number of perianastomotic adhesences, the measurement of rupture pressure was only possible in a small number of cases. The presence of free liquid or abscess in the peritoneal cavity was rarely observed. In the evaluation of inflammation, among the three groups, that of ischemia without methylene blue presented higher scores for mono-morphonuclear cells ($p=0.021$) and granulation tissue ($p=0.044$), with respect to the control group and the ischemia groups using methylene blue. Comparing type I and type III collagen levels, there was no significant difference. **Conclusion:** A greater frequency of perianastomotic adhesences was observed in the rats having undergone ischemia using methylene blue. With respect to the parameters analyzed, it was not possible to confirm beneficial effects of methylene blue in the scarring of the intestinal anastomoses after ischemia and reperfusion.

Key Words: tissue scarring, intestinal ischemia, reperfusion, methylene blue.

1 INTRODUÇÃO

A isquemia mesentérica aguda é uma das mais sérias alterações intra-abdominais, com morbidade e mortalidade extremamente elevadas. Ocorre após súbita redução do fluxo sangüíneo intestinal e, desde que suficientemente intensa e prolongada, causa necrose do intestino¹.

A incidência de tal fenômeno tem aumentado substancialmente nas últimas décadas ¹⁻³. Este incremento se deve ao aumento do número de pacientes idosos com doenças cardiovasculares, mantidos estáveis em decorrência dos avanços farmacológicos e terapêuticos. Assim sendo, muitos pacientes que anteriormente poderiam ir a óbito, hoje, sobrevivem, porém com a possibilidade de desenvolvimento de isquemia mesentérica.

Em crianças e neonatos, a isquemia intestinal afeta o prognóstico de muitas doenças, como na enterocolite necrotizante, na má rotação intestinal, no volvo e no estrangulamento ileal. Representa grande empecilho ao sucesso dos transplantes intestinais⁴.

A interrupção do fluxo sangüíneo intestinal pode ser causada por embolia, trombose ou ser da forma não oclusiva. A sobrevida varia de acordo com a doença responsável envolvida: nos casos da embolia, a taxa de mortalidade é de 50%, sendo de 95% nos pacientes com trombose, 67% na isquemia mesentérica não oclusiva e de 30% nas tromboses venosas mesentéricas⁵. O prognóstico depende da presença e da extensão do infarto intestinal ⁶.

Com a melhor compreensão da fisiopatologia da isquemia mesentérica, desenvolveram-se novos métodos de tratamento, como as técnicas de cateterismo percutâneo, usadas tanto para diagnóstico, como para tratamento. Devido a tais avanços, houve aumento das indicações operatórias, com intervenções muitas vezes mais precoces, levando à melhoria das taxas de mortalidade. A abordagem

da isquemia mesentérica, quando feita em conjunto com profissionais de diferentes especialidades: clínico, radiologista intervencionista, cirurgião e intensivista, leva à melhor sobrevida ⁷.

O intestino recebe 20% do débito cardíaco no repouso e 35% no período pós-prandial. Desta quantidade, 70% irriga a mucosa intestinal. Normalmente, ocorre auto-regulação esplâncnica, a qual atua no metabolismo e no relaxamento miogênico das arteríolas, o que assegura que a perfusão seja mantida dentro de toda a gama de variação de pressão sistêmica ^{8,9}.

No jejum, apenas um entre cinco capilares mesentéricos é mantido patente. No nível de 70mmHg, a pressão arterial conserva uma relação linear com a pressão sistêmica, o que mantém a viabilidade tissular. Abaixo de 40mmHg, ocorre falha no mecanismo compensatório e o intestino torna-se progressivamente mais isquêmico. O metabolismo anaeróbio toma lugar do aeróbio. A lesão passa, então, a ser de acordo com a duração e da extensão anatômica da isquemia ^{8,9}.

Dentro de 15 minutos de absoluta isquemia, há dano estrutural nas vilosidades. Após três horas ocorre necrose da mucosa intestinal. Mesmo neste estado, com restabelecimento do fluxo sangüíneo, pode ocorrer regeneração e formação de novo epitélio nas criptas. Após seis horas de isquemia, ocorre progressão da necrose para toda a parede intestinal. Nesta fase, sem intervenção cirúrgica, ocorrerá perfuração intestinal, sepse e falência de múltiplos órgãos. Nos quadros menos graves de isquemia, especialmente quando localizada, pode ocorrer reparo tecidual e a formação de estenose ¹⁰.

A apresentação do quadro clínico no início da enfermidade é inespecífica, o que leva comumente à demora em se fazer o diagnóstico. A natureza e a rapidez do processo de isquemia é afetada pela integridade da circulação colateral e por desordens da circulação esplâncnica. A primeira ocorre de diversas formas e em pontos anatômicos dentro do sistema gastrointestinal: por meio das arcadas secundárias e terciárias do intestino delgado, da artéria marginal de Drummond e da arcada de Riolan (ligação entre a artéria cólica média e artéria cólica esquerda), da artéria de Moscowitz (ligação entre a artéria cólica média e o ramo

ascendente da artéria cólica esquerda), da arcada de Bühler (ligação entre o tronco celíaco e a artéria cólica média), assim como na rede de vasos sanguíneos submucosos que existem ao longo do intestino¹¹.

Na presença de doença associada, como a aterosclerose, a autorregulação pode tornar-se deficitária, mesmo na presença de pressão arterial sistêmica normal. Os efeitos combinados do tônus do sistema nervoso simpático e das catecolaminas circulantes (endógenas ou exógenas), da ação dos receptores alfa, do sistema renina-angiotensina, da vasopressina, dos tromboxanos e dos leucotrienos, assim como drogas, podem induzir vasoespasmo e isquemia intestinal na ausência de oclusão arterial, mesmo com circulação colateral desenvolvida¹¹.

Muitas vezes é possível restaurar a circulação, sem a necessidade de extensas ressecções das alças intestinais. A oxigenação dos tecidos isquêmicos é fundamental para o reparo tecidual, restaurando o suporte energético e removendo os metabólitos tóxicos. Porém, paradoxalmente, a reperfusão dos tecidos isquêmicos produz eventos inflamatórios, os quais lesam os tecidos¹², com consequências mais sérias que a isquemia propriamente dita¹³.

O mecanismo específico de dano tecidual ainda permanece discutível. Tem sido relatado o aumento da permeabilidade vascular e da leuco-sequestração, além das próprias lesões das mucosas¹⁴. A xantina-oxidase é uma enzima citoplasmática (molibdoproteína) conhecida por seu envolvimento no catabolismo das purinas¹⁵. A oxidação da hipoxantina e da xantina em ácido úrico pela xantina oxidase é acompanhada pela redução do oxigênio molecular a superóxido. Esta reação gera radicais livres de oxigênio¹⁶, os quais têm papel importante como mediadores da lesão de reperfusão¹².

Em situações normais, existe a xantina-desidrogenase intracelular e quando ocorre a isquemia, a mesma é lançada na circulação e transforma-se em xantina-oxidase por proteólise. Com a reperfusão, o oxigênio torna-se disponível e ocorre a oxidação dos metabólitos por meio da xantina-oxidase. Isto provoca degradação dos metabólitos que reagiram com o oxigênio, causando lesão

tissular. Tal reação, além de afetar localmente o intestino, atinge outros órgãos à distância ¹⁷, o que pode contribuir para a falência de múltiplos órgãos.

O efeito local da isquemia-reperfusão nas anastomoses intestinais foi avaliado em vários estudos. Foi demonstrado que a cicatrização é pior nos segmentos submetidos à agressão por isquemia-reperfusão ^{18,19} em decorrência do aumento do processo inflamatório que já ocorre normalmente pelo trauma cirúrgico, na área da anastomose, somado ao evento próprio da isquemia-reperfusão. Torna a resposta inflamatória exagerada, leva a colagenólise na área perianastomótica e compromete sobremaneira a cicatrização ¹⁸.

Para prevenir a formação de radicais livres de oxigênio, várias substâncias têm sido investigadas, sendo a inibição da xantina-oxidase uma delas. O alopurinol, o mais conhecido inibidor da xantina-oxidase, é comprovadamente um agente eficaz ²⁰⁻²². Esse análogo da purina compete com o sítio de purina da enzima.

O azul de metileno apresenta-se como outra substância a ser utilizada, por ser pouco tóxico, solúvel em água e aprovado para uso humano ²³. É consenso que esta substância faça parte de uma nova classe de drogas antioxidantes as quais inibem, por competição, a formação dos radicais livres de oxigênio, agindo com se fosse um receptor alternativo de elétrons da xantina-oxidase ²⁴. Pares de elétrons de cada oxidação enzimática são transferidos para o azul de metileno a partir do centro ferro-sulfúrico da xantina-oxidase, inibindo a conversão do oxigênio e a formação de radicais superóxido.

Existe a possibilidade do azul de metileno, por sua ação como inibidor da formação dos radicais livres, interferir favoravelmente no processo de cicatrização das anastomoses intestinais. Justifica-se a utilização de tal substância pelo potencial de minimizar as complicações pós-operatórias decorrentes da isquemia-reperfusão.

1.1 OBJETIVO

Avaliar a influência do azul de metileno na cicatrização das anastomoses intestinais submetidas à isquemia e reperfusão.

2 LITERATURA

2.1 CICATRIZAÇÃO GASTROINTESTINAL

Afecções sistêmicas graves comumente afetam a função gastrointestinal, de modo a interferir na motilidade, na absorção e na função de barreira. Severas alterações vasculares locais levam à lesão tecidual e ao comprometimento do processo de cicatrização. Muitas vezes, faz-se necessária a realização de anastomose em tais áreas, o que aumenta as chances de complicações. Em situações eletivas, dentro de condições ideais, falhas na anastomose acontecem em 3% a 5% dos casos. Em situações emergenciais, como no trauma, na isquemia e na perfuração, as complicações podem se sobrepor, umas às outras com grande aumento na morbi-mortalidade ²⁵.

O resultado da lesão tecidual é o desencadeamento de complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares, formando cicatriz, embora imperfeita, mas mecanicamente eficaz. A submucosa é extremamente importante, uma vez que suporta os pontos de sutura. É formada por tecido conjuntivo, o qual contém a maioria das matrizes protéicas.

Embora a cicatrização do sistema gastrointestinal siga as mesmas fases da cicatrização da pele, o conhecimento desses eventos é mais limitado ²⁶. A composição da matriz protéica é diferente à da pele, pois contém grande quantidade de colágeno tipo I e menos do tipo III, além de conter também colágeno V. As células musculares lisas são as produtoras predominantes de matrizes protéicas. A submucosa é ricamente vascularizada, com plexos arteriais, venosos e rede de linfáticos. A muscular própria é composta por duas faixas de musculatura lisa: circular e longitudinal. A serosa contém células mesoteliais

dispostas em uma fina faixa de células mesenquimais e matriz, sendo intensamente vascularizada.

A cicatrização gastrointestinal é didaticamente dividida três fases: inflamação, proliferação e maturação tecidual, embora exista sobreposição entre as mesmas ²⁷. Se a mucosa for a única camada lesada, pode haver recuperação da mesma por meio da migração e proliferação. Quando ocorre lesão tecidual mais extensa, há resposta fibroblástica e formação de cicatriz.

A fase inflamatória ocorre logo após a agressão e é caracterizada por infiltração celular e edema, normalmente confinada à submucosa e que dura cerca de duas semanas. Os granulócitos são predominantes nas primeiras 24 horas e os macrófagos nas 48 horas subsequentes. A Angiogênese inicia dois a três dias após a agressão ²⁸. Fibroblastos e principalmente células musculares lisas começam a produzir matriz protéica, inicialmente na submucosa e na subserosa. As células musculares lisas contribuem mais para a formação absoluta do colágeno do que propriamente os fibroblastos.

A recuperação da mucosa é rápida e acontece dentro de uma semana. Se a lesão for severa, com destruição tecidual e proliferação bacteriana, os eventos podem ser mais pronunciados e demorados. Após uma a duas semanas, a barreira epitelial é totalmente restabelecida, com formação granulomatosa devida à proliferação de fibroblastos e musculatura lisa ²⁹. A reconstituição da rede de colágeno é de suma importância à regeneração epitelial. Durante a reparação, a anastomose torna-se mais fina, todavia a muscular da mucosa e a muscular própria permanecem desorganizadas, o que permite o reconhecimento do local da cicatriz por até um ano após a lesão inicial ³⁰.

2.2 MECANISMOS DE LESÃO PELA ISQUEMIA-REPERFUSÃO

A primeira manifestação do processo isquêmico é o aumento da permeabilidade capilar e a formação de edema. À medida que o dano é mais pronunciado, ocorre quebra de enzimas citoplasmáticas na circulação, com alterações teciduais graves, destruindo-os. Nos tecidos isquêmicos reperfundidos há abundante produção de radicais livres de oxigênio, agravando ainda mais os danos iniciais da isquemia ¹⁷.

Radical livre é uma molécula que, por conter número ímpar de elétrons, tem capacidade de ligação, o que lhe confere possibilidade de reação química. Se dois radicais reagem, ambos são eliminados. Se um radical reage com um não radical, disso pode surgir um radical livre. Tal característica capacita os radicais livres a participar de reações em cadeia, que podem ser milhares. A peroxidação de ácidos graxos insaturados pelo oxigênio molecular pode ser iniciada por um radical livre. Radicais podem servir como oxidantes ou redutores.

Como os tecidos isquêmicos tornam-se hipóxicos e até anóxicos, segundo Mc Cord ¹⁷, existe razão para crer que na isquemia há metabolismo aberrante do oxigênio ou ocorre elevada produção de radicais livres de oxigênio, como os superóxidos e as hidroxilas. A maneira como a peroxidação lipídica contribui para os danos causados por infarto e reoxigenação protegida pelos varredores de radicais livres, levou a Meerson et al. ³¹ a propor a existência de um metabolismo de radicais livres de oxigênio na lesão isquêmica cardíaca. Haglund e Lundgren ³² mencionaram que parte substancial da lesão ocorre pela reperfusão pós-isquêmica, no momento em que o oxigênio molecular é reintroduzido no tecido isquêmico.

Os mediadores estudados no mecanismo de lesão da isquemia-reperfusão intestinal são os seguintes: xantina-oxidase ³³⁻³⁷, endotelinas ³⁸⁻⁴⁰, proteínas de choque quente ⁴¹⁻⁴⁶, neutrófilos polimorfonucleares ⁴⁷⁻⁶², óxido nítrico ⁶³⁻⁷⁹, heme oxigenase ⁸⁰⁻⁹², citocinas pró-inflamatórias ⁹³⁻¹⁰⁰, complemento ¹⁰¹⁻¹⁰⁶ e ferro ^{107,108}.

A maior fonte de superóxidos é a enzima xantina-oxidase, tendo sido a primeira fonte biológica de radical superóxido documentada ¹⁰⁹. A xantina-oxidase é uma complexa molibdoflavoproteína, participante do catabolismo das purinas na maioria das células ¹⁵.

A xantina-oxidase é distribuída em vários tecidos, mas é no intestino, no fígado e nos pulmões onde se encontram as mais ricas fontes, na maioria das espécies. A enzima é sintetizada como xantina-desidrogenase, forma presente em 90% dos tecidos saudáveis, e a conversão para xantina-oxidase ocorre nos tecidos isquêmicos⁵². O mecanismo proposto para tal conversão é que a diminuição do fluxo sangüíneo tecidual é suficiente para limitar a disponibilidade do oxigênio para a produção de adenosina trifosfato (ATP). Como diminui a carga de energia das células, a capacidade de manutenção dos gradientes iônicos entre as membranas celulares atenua e ocasiona a redistribuição dos íons cálcio. A concentração plasmática elevada de cálcio ativa uma protease capaz de converter desidrogenase em oxidase. Concomitantemente, a depleção do ATP celular resulta em alta concentração de adenosina monofosfato (AMP). O AMP é metabolizado em adenosina, inosina e em seguida em hipoxantina. A hipoxantina, assim como a xantina, funciona como substrato da purina para a xantina desidrogenase e oxidase. Durante a isquemia, uma nova atividade enzimática ocorre e na reperfusão, o oxigênio molecular serve como substrato para a ativação da xantina-oxidase, seguida por uma explosão na produção de radicais superóxido e hidroxila¹⁰⁹.

Sackler ¹¹¹ descreveu que a mucosa intestinal contém a mais alta concentração de xantina-desidrogenase que qualquer outro tecido. Além do mais, a mucosa intestinal é provavelmente o tecido com maior sensibilidade à lesão isquêmica.

Jarasch et al.¹¹² estudaram a função biológica da xantina-oxidase nas células endoteliais capilares. Pesquisaram que tal enzima torna-se atuante quando há lesão na célula endotelial, quer seja por ataque microbiano, quer por outros efeitos externos que fazem a ativação da enzima na corrente sangüínea,

transformando da forma inofensiva desidrogenase, para a perigosa forma oxidase, quando em contato com oxigênio. Neste estudo, encontraram aumento da concentração de anticorpos xantina-oxidase específicos em todos os humanos testados, sugerindo genericamente, que a formação de tais anticorpos aconteça por auto-imunização dos capilares, talvez induzido por múltiplas pequenas lesões no endotélio. Não explicaram o mecanismo pelo qual o sistema imunológico mantém níveis altos de auto-anticorpos e não adquire tolerância imunológica à xantina-oxidase.

Poggetti et al.¹¹³ demonstraram que a isquemia-reperfusão intestinal causa simultaneamente disfunção hepática e pulmonar e que os neutrófilos ativados têm papel fundamental nesse processo. A xantina-oxidase é aceita como a maior fonte de metabólitos reativos do oxigênio, gerados durante a reperfusão, estando a mesma presente na mucosa intestinal e no endotélio vascular¹¹²⁻¹¹⁴. A importância dos neutrófilos na lesão pela reperfusão é bem destacada e a aderência dos mesmos ao endotélio apresenta-se como um segundo passo necessário. A interação entre as células endoteliais e os polimorfonucleares parece amplificar a produção dos metabólitos ativos do oxigênio e esses polimorfonucleares seqüestrados e aderidos na microvasculatura contribuem para a isquemia¹¹⁵. Polimorfonucleares ativos também liberam proteases e elastases, as quais causam danos adicionais. O exato mecanismo desencadeante do recrutamento dos polimorfonucleares é incerto.

A conversão da xantina-desidrogenase para xantina-oxidase foi bem observada em células endoteliais quando as mesmas são expostas a polimorfonucleares ativados. Isto sugere que uma determinada agressão que ative polimorfonucleares circulantes deva provocar uma interação remota polimorfonucleares-células endoteliais que gera metabólitos ativos do oxigênio, reação dependente da xantina-oxidase ou nadph-oxidase (*β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*). Isso posto, as conseqüências da isquemia-reperfusão podem ser evitadas pela depleção de polimorfonucleares ou pela inativação da xantina-oxidase¹¹⁵.

Hakgüder et al.¹¹⁶ comprovaram, com estudos radiológicos do intestino de ratos que a isquemia-reperfusão altera a motilidade intestinal. Avaliaram também o efeito da isquemia na microcirculação intestinal. Concluíram que com o uso do alopurinol, no intuito de inibir a enzima xantina-oxidase, houve retorno do tempo de trânsito gastroanal, semelhante ao grupo controle.

As endotelinas são potentes peptídeos vasoconstritores derivados do endotélio vascular, as quais, pelo mecanismo de vasoconstrição, podem estar envolvidas na isquemia intestinal³⁸⁻⁴⁰. Quando ocorre inibição das mesmas, ocorre diminuição das lesões mucosas, aumento do fluxo sangüíneo e diminuição da adesão leucocitária¹¹⁷.

As proteínas de choque quente são substâncias intracelulares que se acumulam após a isquemia intestinal⁴¹. O exato mecanismo de ação protetora de tais proteínas é incerto. O mecanismo mais provável seria pela inibição do leucotrieno-b₄ e subsequente prevenção da ativação neutrofílica e da quimiotaxia⁴⁵.

Os polimorfonucleares também estão entre os possíveis mediadores envolvidos na fisiopatologia da isquemia-reperfusão intestinal. Massberg et al.⁵¹ mostraram que a primeira manifestação ocorrida na isquemia-reperfusão intestinal é decorrente da interação dos leucócitos com as células endoteliais nas vênulas submucosas.

O óxido nítrico é um radical livre e uma substância extremamente reativa. É sintetizado a partir da L-arginina, de uma família de enzimas conhecidas por óxido nítrico sintases⁶⁴. Existem várias possíveis fontes de óxido nítrico no intestino: no tecido intestinal intrínseco (epitélio, mastócitos, músculo liso e plexo neural) e nos leucócitos (polimorfonucleares e monócitos)⁶⁷. A atuação do óxido nítrico ainda é controversa⁶⁸.

A expressão da heme-oxigenase em vários modelos de isquemia-reperfusão intestinal tem mostrado efeito citoprotetor durante a cascata de eventos da isquemia e reperfusão⁸⁰⁻⁸³. É uma enzima relacionada com a conversão do heme, do monóxido de carbono e do ferro livre⁸⁴. Exerce importância central na

manutenção da homeostase dos processos antioxidativos e oxidativos durante a lesão celular ⁸⁵.

Os eventos bioquímicos precisos de interação da geração de radicais livres e da secreção de mediadores inflamatórios pelas células endoteliais não são bem entendidos. As proteínas pró-inflamatórias são provavelmente sintetizadas pela influência do óxido nítrico ⁹³, mas seu mecanismo exato como mediadoras na isquemia intestinal é incerto.

Vários autores têm sugerido o sistema complemento como o maior responsável no entendimento da patogênese da isquemia-reperfusão intestinal ¹⁰¹⁻¹⁰⁴. A ativação do sistema complemento leva a uma série de potentes eventos inflamatórios, como a expressão do gene ICAM-1, ao aumento das citocinas do fator alfa de necrose tumoral e das interleucinas ¹⁰⁴.

O ferro é uma substância aceleradora do processo de formação de radicais livres. Durante a isquemia, metabólitos como o ácido láctico, acumulam-se, o que aumenta o pH intracelular. Isso desestabiliza as membranas lisossomais, ativa enzimas de lise lisossômica, inibe a ligação do ferro com suas proteínas carreadoras e torna o mesmo livre. O ferro, nessa condição, reage com a água e gera a formação do deletério radical hidroxila ¹⁰⁸.

2.3 ANASTOMOSES INTESTINAIS E ISQUEMIA-REPERFUSÃO

A isquemia, muitas vezes, causa necrose de segmentos do intestino, os quais se tornam inviáveis, exigindo ressecção. Sempre que possível, o objetivo é a criação de anastomose na tentativa de restabelecer o trânsito intestinal da maneira mais fisiológica possível. Porém, o intestino próximo ao ressecado, aparentemente viável, pode ter sido submetido à isquemia transitória significativa, o que pode alterar o processo de cicatrização.

Vários fatores são implicados no sucesso ou na falha do processo de cicatrização das anastomoses intestinais. O suprimento sanguíneo e a oxigenação

das anastomoses são de suma importância e dependem da vascularização intrínseca ²⁶. A falha de numerosos mediadores vasoativos, peptídeos endoteliais, radicais livres de oxigênio e a ativação de leucócitos decorrentes da reperfusão intestinal levam à disfunção endotelial, ao edema tecidual e ao não retorno do fluxo sanguíneo, o que pode comprometer a perfusão anastomótica ¹¹⁸⁻¹²⁰.

Ponsky et al. ¹²¹ estudaram os efeitos da isquemia transitória nas anastomoses intestinais de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Dividiram a amostra em três grupos de animais, sendo um controle (sem isquemia), outro, isquemia por 30 minutos e o terceiro, isquemia por 45 minutos. Os animais foram submetidos à eutanásia no sétimo e décimo dia de pós-operatório, com tomada da medida de pressão de ruptura das anastomoses. Não observaram diferença significativa entre os grupos.

Bergren et al. ¹²² avaliaram a eficácia da enzima superóxido-dismutase, que age como um varredor de radicais livres, nas anastomoses intestinais submetidas à isquemia segmentar e reperfusão. Dividiram os ratos em três grupos de dez: um deles com anastomose sem isquemia; um segundo grupo com isquemia e anastomose e um terceiro com isquemia, anastomose e superóxido-dismutase. A eutanásia ocorreu após duas semanas. Tomadas as medidas da pressão de ruptura, análise histológica e percentagem de sobrevivência, concluíram que o varredor de radicais livre superóxido-dismutase aumentou a sobrevivência e limitou a morbidade. Não foi observada alteração no processo de cicatrização.

Segundo Demirogullari et al. ¹⁸, apesar do grande número de trabalhos referentes à cicatrização intestinal, não foram suficientemente estudados os efeitos da isquemia-reperfusão nas anastomoses intestinais. Compararam as anastomoses intestinais após isquemia, feitas em tempos diferentes durante o período de reperfusão. Foram 30 ratos alocados em 5 grupos (quatro experimentos e um controle). Realizaram clampeamento arterial intestinal por 40 minutos, com anastomose após 20 minutos, noventa minutos, seis horas e 24 horas após a reperfusão. Fez-se a eutanásia no quinto dia de pós-operatório, com

análise da pressão de ruptura e estudo histológico das anastomoses. Comentaram que as anastomoses realizadas precocemente são mais resistentes que as feitas tardiamente. A razão disso é incerta. Notaram maiores alterações na mucosa intestinal quando a anastomose era realizada precocemente (20 e 90 minutos).

Udassin et al.⁹ demonstraram dano aparente à mucosa intestinal após 10 minutos de reperfusão. Quase 80% deste dano desaparece após 6 horas e há resolução completa após 12 horas de clampeamento transitório segmentar da artéria mesentérica cranial do rato.

Kuzu et al.¹⁹ pesquisaram o efeito da lesão por reperfusão na cicatrização das anastomoses intestinais. Utilizaram 102 ratos, distribuídos em três grupos, sendo um controle. Houve clampeamento da artéria mesentérica cranial num grupo por 30 minutos, porém no terceiro grupo, realizaram o que chamaram de isquemia profunda. Tal isquemia consistiu no clampeamento de vasos sangüíneos intestinais colaterais associado ao clampeamento da artéria mesentérica cranial. Os animais de cada grupo foram submetidos à eutanásia no terceiro ou no sétimo dia de pós-operatório, com avaliação da cicatrização da parede abdominal, aderências intracavitárias, complicações anastomóticas, pressão de ruptura e local da ruptura. Demonstraram que a isquemia-reperfusão impede a cicatrização anastomótica, mas não houve diferença significativa na cicatrização e nas complicações entre os grupos de isquemia habitual e profunda.

2.4 ESTRATÉGIAS PROTETORAS CONTRA OS DANOS DECORRENTES DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO INTESTINAL

Várias modalidades terapêuticas têm sido utilizadas com sucesso na atenuação dos danos decorrentes da isquemia–reperfusão em modelos animais. São elas: pré-condicionamento isquêmico, suplementação de óxido nítrico, terapia anticomplemento, terapia antileucocitária, perfluorocarbonos, nutrição enteral, suplementação de glutamina e de glicina e uso de antioxidantes.

O pré-condicionamento isquêmico é definido pela breve exposição de um tecido a isquemia, com o objetivo de protegê-lo dos efeitos deletérios de uma isquemia prolongada ¹²³. Tal fenômeno foi descrito pela primeira vez em 1986 no coração canino ¹²⁴. Efeitos benéficos de tal modalidade foram demonstrados no fígado ¹²⁵, no músculo esquelético ¹²⁶, no cérebro ¹²⁷, na coluna espinhal ¹²⁸, no rim ¹²⁹, pulmão ¹³⁰, na retina ¹³¹ e no intestino ¹³²⁻¹³⁵. A primeira descrição do pré-condicionamento isquêmico no intestino foi feita por Hotter et al. em 1996 ¹³⁶, o que representou particular avanço no transplante intestinal ¹³⁷.

A suplementação de óxido nítrico demonstrou-se eficaz na atenuação da isquemia-reperfusão em gatos e cães ^{138,139}. Demonstrou-se efeito benéfico pela inalação de óxido nítrico em baixa concentração, dado pela profunda ação antiaderência leucocitária ¹⁴⁰.

A terapia anticomplemento diminuiu significativamente os danos decorrentes da isquemia-reperfusão, pela administração de um antagonista de receptor de complemento (C5a) em ratos ¹⁰². Tal antagonista inibiu a expressão do fator alfa de necrose tumoral e conseqüentemente a lesão tissular.

Existem três estratégias conhecidas para atenuar a agressão leucocitária: - inibição da ativação leucocitária; - inibição da síntese molecular de adesão leucocitária e inibição da adesão leucócito-endotelial ¹⁴¹. A ativação dos leucócitos na isquemia-reperfusão intestinal é auxiliada por mediadores inflamatórios como o leucotrieno b₄, pelo fator ativador de plaquetas e pelo fator alfa de necrose tumoral ⁵⁶. Estudos demonstraram que o uso de antagonistas do leucotrieno b₄ ¹⁴², de antagonistas do fator ativador de plaquetas ^{143,144} e de inibidores do fator alfa de necrose tumoral ¹⁴⁵ limitam a ativação leucocitária na isquemia-reperfusão intestinal. Em relação à inibição da síntese molecular de adesão leucocitária pode-se recorrer à transcrição de tais fatores que regulam a adesão leucocitária ^{146,147}. A terceira estratégia, que consiste em limitar a adesão leucócito-endotélio, pode ser obtida pelo uso de substâncias como alopurinol e superóxido-dismutase ¹⁴⁸ e anticorpos monoclonais ¹⁴⁹.

Os perfluorocarbonos são moléculas hidrocarbônicas nas quais os átomos de hidrogênio são substituídos por fluorina. Esses elementos têm a capacidade de dissolver 20 a 25 vezes mais oxigênio do que o plasma, em temperatura ambiente. A administração intraluminal de perfluorocarbonos oxigenados dentro do intestino demonstrou-se benéfica quanto à preservação da integridade da mucosa, após isquemia e reperfusão ¹⁵⁰.

A nutrição enteral comprovadamente reduz a morte e as lesões orgânicas à distância em ratos ¹⁵¹. A nutrição também mantém a imunidade mucosa e a resistência contra infecções. Ratos mantidos com nutrição parenteral e sem receber alimentação enteral tiveram os níveis de ICAM-1(*intercellular adhesion molecule-1*) e de P-seletina aumentados e, com isso aumentaram a atração de polimorfonucleares para o intestino, em comparação com ratos submetidos a nutrição enteral ¹⁵². Além disso, a perda do aporte nutricional enteral altera os níveis de interleucina-4 e de interleucina-10 na lâmina própria intestinal, responsáveis por inibir a expressão endotelial do ICAM-1(*intercellular adhesion molecule-1*) ¹⁵³.

A glutamina, que é considerada um aminoácido não essencial, torna-se extremamente importante durante lesão severa ¹⁵⁴. É o aminoácido mais abundante do plasma e da musculatura esquelética em condições normais, mas seus níveis caem substancialmente após lesões ou operações ¹⁵⁵. Estudos demonstraram que a suplementação de glutamina via enteral e parenteral diminuiu a translocação bacteriana, atenuou colite experimental e melhorou a adaptação da mucosa intestinal após ressecção intestinal ^{156,157}. Em modelos animais de transplante intestinal, a glutamina melhorou a absorção de nutrientes e também a função de barreira mucosa ¹⁵⁸. Ikeda et al. ¹⁵⁹, em modelo de isquemia-reperfusão intestinal em ratos, demonstraram que a suplementação com glutamina melhorou a integridade mucosa, pela preservação dos níveis de imunoglobulina-a nos pulmões e no intestino, além de reduzir a expressão de ICAM-1 no intestino e a adesão neutrofílica.

A glicina, outro aminoácido não essencial, protege o intestino da isquemia-reperfusão ¹⁶⁰⁻¹⁶². A glicina é conhecida por seu efeito antiinflamatório, imunomodulador e pelas funções citoprotetoras diretas ¹⁶¹⁻¹⁶³. Em ratos, a administração de 20% de glicina atenuou o dano à mucosa, preservou o conteúdo protéico intestinal, reduziu a translocação bacteriana e aumentou a sobrevivência ⁽¹⁶⁰⁾. A glicina atua nas células inflamatórias como nos macrófagos, e suprime a ativação de fatores de transcrição e a formação de radicais livres e de citocinas inflamatórias ¹⁶⁴.

O corpo humano é dotado de uma série de antioxidantes naturais, mas, infelizmente, não são capazes de proteger o organismo contra agressões mais sérias, como na isquemia-reperfusão intestinal. Foram estudados vários tipos de antioxidantes efetivos no combate aos danos decorrentes da isquemia-reperfusão intestinal: alopurinol ¹⁶⁵, anti-trombina-III ¹⁶⁶, bilirrubina ⁹², edavarone ⁹¹, captopril ¹⁶⁷, ciclosporina ¹⁶⁸, desferrioxamine ¹⁶⁹, fator de crescimento epidérmico ¹⁷⁰, glutamina ¹⁷¹, melatonina ¹⁷², n-acetil cisteína ¹⁴⁴, nitroglicerina ¹⁷³, piruvato ¹⁷⁴, rapamicina ¹⁶⁸, sod ¹⁴⁸, trimetazidina ¹⁷⁵, verapamil ¹⁷⁶, vitamina C e vitamina E ¹⁷⁷, e azul de metileno ¹⁷⁸.

2.5 AZUL DE METILENO

Há descrições do uso do azul de metileno no tratamento da tuberculose urinária, da intoxicação por cianida, da metahemoglobinemia, da intoxicação por nitrito, das infecções do trato urinário (apud Salaris et al. ²⁴) e do envenenamento pelo herbicida Paraquat® ²³.

O azul de metileno foi apontado originalmente como eliminador da produção de superóxidos na presença do citocromo C e seu uso na lesão por reperfusão por Mc Cord e Fridovich ¹⁷⁹ e mais tarde por Kelner et al. ¹⁸⁰. Atua pela competição com o oxigênio molecular para a transferência de elétrons pela xantina-oxidase. Pares de elétrons de cada oxidação enzimática são transferidos

para o azul de metileno. Tal transferência de elétrons desvia seu fluxo do centro ferro-sulfúrico enzimático, onde o oxigênio molecular é convertido em radicais superóxido e então, a geração desses mediadores citotóxicos é atenuada ^{23,24}. Esses últimos autores, revisando os mecanismos de ação do azul de metileno, constataram a possibilidade de sua utilização na inibição de superóxidos nos tecidos isquêmicos. Salaris et al. ²⁴, instigados por tais observações, avaliaram o papel do azul de metileno como possível inibidor da produção de superóxido pela xantina-oxidase. Propuseram que o azul de metileno poderia atenuar os efeitos da lesão por reperfusão: se fosse dado um pré-tratamento (antes da isquemia), de forma a atenuar o acúmulo de hipoxantina durante a isquemia ou se fosse administrado azul de metileno logo após a isquemia-reperfusão, de maneira a inibir a produção de superóxido. Apontaram que o mesmo exerce um efeito antioxidante efetivo na isquemia-reperfusão.

Estudaram-se os efeitos do azul de metileno na síntese e nos efeitos biológicos do óxido nítrico. Constatou-se ser o azul de metileno inibidor da óxido nítrico sintase, a qual bloqueia o relaxamento da musculatura lisa endotelial ¹⁸¹. O óxido nítrico é sintetizado a partir da L-arginina. A vasodilatação mediada pelo óxido nítrico é dependente da ativação da guanilil-ciclase e o azul de metileno foi descrito como inibidor da guanilil-ciclase solúvel, tanto *in vivo* quanto *in vitro* ¹⁸².

A produção aumentada de óxido nítrico tem papel central no desenvolvimento do choque séptico. Keaney Jr et al. ¹⁸³ avaliaram o efeito do azul de metileno no choque séptico induzido pela administração de lipopolissacarídeos, em coelhos e constataram que o mesmo reverte a hipotensão causada pela ação das endotoxinas.

Zhang et al. ¹⁸⁴ examinaram várias doses de azul de metileno na alteração do fluxo sanguíneo e da viabilidade tecidual na circulação mesentérica, renal e femoral, em cães submetidos a choque endotóxico. Doses baixas a moderadas aumentaram significativamente a pressão arterial e doses baixas seletivamente aumentaram o fluxo sanguíneo mesentérico. Quando usado em altas doses, poderia ser potencialmente deletério por hipertensão pulmonar.

Estudos *in vitro* de isquemia, seguida de reoxigenação demonstraram que o azul de metileno é efetivo na prevenção dos danos causados, pelos radicais livres de oxigênio, ao fígado e aos rins²⁴. Galili et al.¹⁴ investigaram os efeitos do azul de metileno na lesão pulmonar causada pela reperfusão após isquemia intestinal. Notaram que, após uma hora de oclusão da artéria mesentérica cranial, a reperfusão induziu à lesão pulmonar, manifestada por edema intersticial e alveolar, além de seqüestro de neutrófilos. Concluíram que o azul de metileno atenuou tais lesões, com efeito protetor no tecido pulmonar.

Peter et al.¹⁸⁵, com o objetivo de prevenir encefalopatia induzida pelo quimioterápico ifosfamida, avaliaram a farmacocinética e a distribuição do azul de metileno oral e intravenoso. O azul de metileno é utilizado de rotina na prevenção e tratamento de tal complicação, embora o mecanismo e o sítio de ação permaneçam incertos. Verificaram que é bem absorvido pelo sistema gastrointestinal, mas a distribuição aos órgãos é diferente em relação à via endovenosa. A sua distribuição endovenosa tem padrão multifásico e meia-vida de 5,25 horas. A excreção urinária é maior após a administração endovenosa. Se o sítio de ação do azul de metileno na prevenção da encefalopatia causada pela ifosfamida for o fígado (onde a ifosfamida é ativada e potencialmente gera metabólitos tóxicos), a administração oral e endovenosa tem efeito semelhante. Contudo, se o sítio de ação for o sistema nervoso central, a administração endovenosa resulta em maiores concentrações do azul de metileno no cérebro, devendo ser a via preferencial.

Weinbroun et al.¹⁸⁶ avaliaram os efeitos do azul de metileno na atenuação da deterioração metabólica e hemodinâmica decorrente da isquemia e reperfusão. Compararam a infusão de azul de metileno em várias doses, por meio da via intra-traqueal e intra-peritoneal. As alterações eram verificadas pela dosagem da pressão sangüínea, gasometria e medida do nível da xantina-oxidase e xantina-desidrogenase. Ilustraram a capacidade dose-dependente do azul de metileno em conter o desenvolvimento dos efeitos deletérios após isquemia-reperfusão e da similaridade de ambas as vias de administração. Consideraram ser o azul de metileno componente já estabelecido clinicamente como inibidor da geração de

radicais livres de oxigênio. Adicionalmente, tem efeito vasoconstritor, pois antagoniza os efeitos do óxido nítrico no relaxamento da musculatura lisa vascular, pelo bloqueio dos sítios de ligação do óxido nítrico e guanilil-ciclase.

Memis et al.¹⁸⁷ infundiram azul de metileno em pacientes durante sepsis severa, com o intuito de verificar se havia alteração nos níveis de citocinas. Foram medidos: fator alfa de necrose tumoral, interleucina 1, receptor da interleucina 2, interleucina 6 e interleucina 8. Após, foram aferidos parâmetros hemodinâmicos, gases sanguíneos, metahemoglobina e parâmetros bioquímicos. Quando comparado com o grupo placebo, o grupo azul de metileno teve maior aumento do nível médio de pressão arterial e da metahemoglobinemia, esta última apenas logo após a infusão. Verificaram também que o azul de metileno não alterou os níveis de citocinas ou interferiu na sobrevida, na sepsis severa. Resultou apenas em aumento transitório da pressão arterial.

Ilhan et al.⁴ determinaram os efeitos do anticorpo monoclonal anti-ICAM-1, do alopurinol e do azul de metileno na lesão por isquemia-reperfusão intestinal. O ICAM-1(*intercellular adhesion molecule-1*) é um importante mediador da adesão de neutrófilos ao endotélio vascular. Presente na superfície das células endoteliais num grau moderado pode ser fortemente aumentado em um curto período pelas citocinas. O fator alfa de necrose tumoral é uma das citocinas e pode ser ativado por uma série de células, incluindo hepatócitos, células T, neutrófilos e macrófagos. Verificaram as alterações histopatológicas, o nível de fator alfa de necrose tumoral e a atividade da mieloperoxidase nos ratos submetidos à isquemia-reperfusão intestinal. Evidenciaram neste estudo que a aplicação de alopurinol e do ICAM-1 atenuou o efeito deletério da isquemia-reperfusão, porém, ainda não se sabe ao certo qual o melhor momento de aplicação dos produtos, nem o tempo de duração da isquemia. O azul de metileno não foi efetivo para prevenir ou atenuar a lesão tissular intestinal. Os autores sugeriram novos estudos com doses diferentes para confirmação ou não de tais resultados.

3 MÉTODOS

Para realização deste estudo obedeceu-se à Lei Federal 6.638¹ e às orientações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), entidade filiada ao *Internacional Council for Laboratory Animal Science*. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Pesquisa com Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, conforme protocolo número 013/03.

3.1 ANIMAL DE EXPERIMENTAÇÃO

3.1.1 Caracterização da Amostra

Utilizaram-se 45 ratos machos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, provenientes do Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, distribuídos aleatoriamente em 3 grupos de 15 animais: grupo controle e grupo isquemia sem o uso de azul de metileno e grupo isquemia com o uso de azul de metileno. As idades variaram entre 100 e 150 dias e peso entre 250 e 400 gramas, com média de 337,13 gramas e desvio padrão de 54,53 gramas.

3.1.2 Ambiente de Experimentação

Mantiveram-se os animais em grupos de quatro animais, em caixas de polipropileno, de dimensões apropriadas para a espécie, no Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná. O ciclo claro/escuro era de 12 horas e a umidade relativa do ar ambiental era o mesmo do ambiente geral, sem regulação artificial e a temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Receberam ração específica para a espécie (NUVILAB, NUVITAL®) e água *ad libitum*.

¹ BRASIL. Lei Federal n.º 6638 de 8 de maio de 1979. Estabelece normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais e determina outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, p.1, 10 de maio de 1979.

Realizaram-se as operações no Centro Cirúrgico da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da PUC-PR.

3.1.3 Organização dos Grupos de Estudo

Separaram-se os ratos em três grupos, sendo o grupo 1 (controle) sem clampeamento arterial e os grupos 2 e 3 com clampeamento. Destes, o grupo 2 foi tratado com placebo (solução salina isotônica) e o grupo 3 com azul de metileno.

3.1.4 Anestesia

Induziu-se anestesia geral por injeção intramuscular de 60mg/kg de Cetamina (Ketamin® - 50mg/ml) associada a 7,5mg/kg de Xilasina (Rompun® - 2g/100ml). Os animais permaneceram anestesiados até o final da operação.

3.1.5 Preparo da Pele e Posicionamento da Mesa

Realizou-se depilação da parede abdominal ventral por tricótomo elétrico e fixação do animal em prancheta cirúrgica na posição de decúbito dorsal. Em seguida, fez-se a anti-sepsia da pele com polivinilpirrolidona-iodo ativo a 1%.

3.1.6 Laparotomia

Utilizou-se incisão mediana de 4,0 cm, iniciando na borda superior da pube, com abertura de todos os planos da parede abdominal e exposição da cavidade abdominal.

3.1.7 Procedimento

Nos três grupos a 20cm do piloro fez-se secção completa do intestino delgado e anastomose término-terminal, com 8 pontos separados em um único plano de síntese, extramucoso, com fio monofilamentar de náilon 6-0.

Nos animais do grupo 1 construiu-se anastomose intestinal sem nenhuma lesão prévia, enquanto nos grupos 2 e 3 (isquemia-reperfusão), ocorreu oclusão temporária segmentar da artéria mesentérica cranial pelo tempo de 45 minutos. Para esse fim utilizou-se segmento de submucosa intestinal porcina, a qual era amarrada delicadamente ao redor do vaso.

Após a oclusão vascular nos grupos 2 e 3, realizou-se laparorrafia provisória, de modo a minimizar desidratação e perda excessiva de temperatura.

Após 45 minutos (tempo relativo à oclusão vascular), reabriu-se a cavidade abdominal nos grupos 2 e 3. Neste momento, instilaram-se na cavidade abdominal 2ml de solução de azul de metileno a 0,5% estéril no grupo 2 e de 2ml de solução salina isotônica no grupo 3 (Figura 1) e imediatamente após realizou-se a liberação da oclusão vascular. Assim que confirmada a reperfusão por meio de pulsação da artéria mesentérica, confeccionou-se anastomose intestinal no local acima descrito, como no grupo controle.

3.1.8 Laparorrafia

Realizou-se laparorrafia com dois planos de síntese. O primeiro, peritônio-músculo-aponeurótico e o segundo, o da pele, com aplicação de sutura monofilamentar de náilon 3-0.



Figura 1- Aspecto das alças intestinais após injeção de azul de metileno e desclameamento

3.1.9 Pós-operatório

Após a recuperação anestésica, devolveram-se os ratos às suas caixas, devidamente identificadas, onde receberam água e ração padrão comercial *ad libitum*. Permaneceram sob este regime até a data prevista para aferição do experimento.

3.1.10 Eutanásia

Realizou-se eutanásia com dose letal da solução anestésica de Cetamina e Xilazina utilizada nas operações, no 7.º dia de pós-operatório.

3.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

3.2.2 Anastomoses Intestinais

Constatada a morte, fixaram-se os animais em pranchetas cirúrgicas e reabriu-se a parede abdominal pela mesma incisão da primeira operação.

Classificaram-se as aderências nas anastomoses em graus 0, I, II, III e IV, conforme a escala convencionada:

- grau 0: ausentes
- grau I: presentes, comprometendo $\frac{1}{4}$ da circunferência anastomótica;
- grau II: presentes, comprometendo $\frac{2}{4}$ da circunferência anastomótica;
- grau III: presentes, comprometendo $\frac{3}{4}$ da circunferência anastomótica;
- grau IV: presentes, comprometendo $\frac{4}{4}$ da circunferência anastomótica.

3.2.3 Estudo Tensiométrico

Ressecou-se um segmento de intestino delgado de aproximadamente 4cm, que continha a anastomose, o qual foi lavado com solução salina a 0,9% e colocado dentro de um recipiente cúbico contendo água. Tal recipiente continha uma entrada de ar em uma de suas paredes laterais, com válvula unidirecional, sob a forma de “bico”.

Amarrou-se a extremidade proximal do segmento intestinal ressecado com ligadura dupla de fio de algodão 3-0 em torno da entrada de ar, de modo que o “bico” de ar ficasse dentro do intestino, o que permitia entrada de oxigênio para a sua luz. Na extremidade distal do intestino, realizou-se sutura em bolsa, de modo a bloquear a saída de oxigênio vindo da outra extremidade. O intestino, então, permaneceu na posição horizontal e totalmente submerso na água. Introduziu-se um cateter de 0,7mm de diâmetro por 70mm de comprimento na luz do intestino e conectado à entrada de ar. Na entrada de ar havia um dispositivo, com uma via conectada a um cilindro de oxigênio a 100%, no fluxo de 1 litro por minuto e outra a uma coluna graduada de pressão em mmHg.

Após iniciado o fluxo de oxigênio, foram registrados os níveis pressóricos no momento da ruptura, indicada pelo borbulhamento de ar vindo do interior da luz intestinal.

Em seguida, abriu-se a peça cirúrgica longitudinalmente pela borda antimesentérica, observou-se o aspecto interno da região anastomótica e avaliou-se a epitelização, e se a mesma era maior ou menor que 50% da extensão da anastomose.

As peças foram estendidas em papel filtro, mergulhadas em frascos numerados e fixadas em formalina tamponada a 10% e assim encaminhadas a estudo histopatológico.

3.3 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

As peças foram emblocadas em parafina e dos blocos obtiveram-se cortes. Analisaram-se os cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina, por meio de microscópio óptico marca Olympus® modelo BX-51.

Avaliaram-se campos representativos da área de anastomose e neles os achados de fibrose, reação inflamatória, edema, congestão vascular e presença de tecido de granulação, seguindo-se escore numérico, com notas negativas para as variáveis agudas e positivas para as crônicas¹⁸⁸, segundo o quadro abaixo:

Quadro 1 : Variáveis usadas para estabelecer escore final quanto à inflamação

Processo inflamatório	Variável	Discreto	Moderado	Acentuado
Agudo -	Polimorfonucleares*	-1	-2	-3
	Edema	-1	-2	-3
	Congestão	-1	-2	-3
Crônico +	Monomorfonucleares*	1	2	3
	Fibrose	1	2	3
	Tecido de Granulação	1	2	3

*Análise das células inflamatórias:

Até 50 células em ¼ de campo de grande aumento (x400) = 1

De 50 a 100 células em ¼ de campo de grande aumento (x400) = 2

Mais de 100 células em ¼ de campo de grande aumento (x400) = 3.

O escore final foi a soma de todas as seis variáveis. Resultados positivos foram considerados como predomínio de resposta inflamatória crônica e resultados negativos como predomínio de resposta inflamatória aguda.

Outros cortes histológicos das mesmas amostras foram submetidos à coloração pelo corante *sirius red*, no intuito de se determinar a concentração do colágeno. As fibras mais espessas e fortemente birrefringentes apresentaram-se coradas em vermelho-alaranjado (colágeno tipo I), e as fibras mais finas, dispersas, fracamente birrefringentes coraram-se de tons verdes (colágeno tipo III), quando submetidas à luz polarizada¹⁸⁹.

Estudaram-se cinco campos microscópicos com 200 aumentos submetidos à luz polarizada. Campos representativos da área de anastomose, incluindo pelo menos um superficial, um médio e um profundo, foram capturados utilizando-se microscópio Olympus® BX-51. O microscópio conectava-se a câmera digital e a um computador com software de análise de imagens (*IMAGE-PRO-PLUS® - THE PROVEN SOLUTION - Versão 4.5.1.23 para Windows 98/NT/ME/200/XP Professional, Copyright 1993-2002 Media Cybernetics Inc.*). Estes campos então foram submetidos à análise da área ocupada pelo colágeno tipo I (tons de vermelho e alaranjado) e do colágeno tipo III (tons de verde), conseguindo-se ao final a percentagem da área relativa de um sobre o outro.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Recorreu-se à análise descritiva dos dados através de quadros e gráficos. Para comprovação do objetivo levantado neste trabalho, foram utilizadas a Análise de Variância para amostras independentes (ANOVA *One Way*) e os testes paramétricos “t de Student” e os não-paramétricos “Mann-Whitney” e “Kruskal-Wallis” (através do *software “Primer of Biostatistics”*) e “Exato de Fischer” (pelo Epi-Info). O nível de significância (probabilidade de significância) adotado foi menor que 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 O MODELO ANIMAL

Mesmo após ter sido definido o tempo de 45 minutos de clampeamento e a dose de azul de metileno no estudo piloto, constatou-se o óbito nos animais dos grupos, a saber: no controle: um óbito no pós-operatório imediato, por acidente anestésico; no grupo isquemia: 2 óbitos no 4.º e 5.º dias de pós-operatório, decorrentes de peritonite após deiscência da anastomose; no grupo azul de metileno: 4 óbitos no 3.º, 4.º e 5.º dias, também por peritonite e deiscência anastomótica.

Observou-se a presença de aderências em todas as anastomoses intestinais, dificultou a preparação dos segmentos intestinais para o estudo tensiométrico. A constatação de líquido livre ou abscesso na cavidade peritoneal foi rara.

4.2 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA

Na comparação entre os grupos (Quadros 2 e 3) observou-se que:

- apenas o grupo controle apresentou líquido incolor e inodoro livre na cavidade abdominal, quando comparado com o grupo de isquemia sem o uso de azul de metileno ($p=0,004$) e com o grupo de isquemia com o uso de azul de metileno ($p=0,007$);

- o grupo de isquemia com o uso de azul de metileno apresentou maior quantidade de aderências perianastomóticas, quando comparado com o grupo controle e com o grupo de isquemia sem o uso de azul de metileno ($p=0,008$).

Quadro 2 – Avaliação macroscópica nos grupos de estudo

DADOS	CONTROLE (n = 14)		ISQUEMIA (n = 13)		AZUL (n = 11)		TOTAL (n = 38)	
	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
FERIDA OPERATÓRIA								
• Não	14	100,0	12	92,3	10	90,9	36	94,7
• Sim	-	-	01	7,7	01	9,1	02	5,3
LÍQUIDO ABDOMINAL								
• Não	07	50,0	13	100,0	11	100,0	31	81,6
• Sim	07	50,0	-	-	-	-	07	18,4
ABSCESSE INTRA-ABDOMINAL								
• Não	13	92,9	12	92,3	11	100,0	36	94,7
• Sim	01	7,1	01	7,7	-	-	02	5,3
ADERÊNCIA ANASTOMOSE								
• Grau 0	04	28,6	-	-	-	-	04	10,5
• Grau I	06	42,9	06	46,1	04	36,4	16	42,1
• Grau II	02	14,3	05	38,5	06	54,5	13	34,2
• Grau III	01	7,1	02	15,4	01	9,1	04	10,5
• Grau IV	01	7,1	-	-	-	-	01	2,7

Quadro 3 – Resultado dos testes aplicados na comparação entre os grupos – Avaliação macroscópica

DADOS	CONTROLE x ISQUEMIA		
	Teste Aplicado	Valor de p	Significância
Ferida Operatória	Fisher	0,481	NS*
Líquido Abdominal	“	0,006	S**
Abscesso Intra-Abdominal	“	1	NS*
Aderência na Anastomose	Mann-Whitney	0,595	NS*

DADOS	CONTROLE x AZUL		
	Teste Aplicado	Valor de p	Significância
Ferida Operatória	Fisher	0,440	NS*
Líquido Abdominal	“	0,008	S**
Abscesso Intra-Abdominal	“	1	NS*
Aderência na Anastomose	Mann-Whitney	0,008	S**

DADOS	ISQUEMIA x AZUL		
	Teste Aplicado	Valor de p	Significância
Ferida Operatória	Fisher	1	NS*
Líquido Abdominal	-	-	-
Abscesso Intra-Abdominal	Fisher	1	NS*
Aderência na Anastomose	Mann-Whitney	0,008	S**

(*) NS: Não significante

(**) S: Significante

Ressalta-se que a pressão de ruptura não foi possível de analisar estatisticamente em razão do pequeno número de dados.

4.3 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

4.3.1 Avaliação da Inflamação

Na avaliação do escore (Quadros 4 e 5), comparando-se os três grupos simultaneamente, observou-se que o grupo com isquemia sem uso do azul de metileno apresentou escore entre discreto e moderado (mais elevado) para as células monomorfonucleares ($p=0,021$) e tecido de granulação ($p=0,044$) (Gráfico 1). Repete-se o quadro 1, com as variáveis utilizadas, no intuito de facilitar a interpretação dos quadros 4 e 5.

Quadro 1 : Variáveis usadas para estabelecer escore final quanto à inflamação

Processo inflamatório	Variável	Discreto	Moderado	Acentuado
Agudo -	Polimorfonucleares*	-1	-2	-3
	Edema	-1	-2	-3
	Congestão	-1	-2	-3
Crônico +	Monomorfonucleares*	1	2	3
	Fibrose	1	2	3
	Tecido de Granulação	1	2	3

*Análise das células inflamatórias:

Até 50 células em $\frac{1}{4}$ de campo de grande aumento (x400) = 1

De 50 a 100 células em $\frac{1}{4}$ de campo de grande aumento (x400) = 2

Mais de 100 células em $\frac{1}{4}$ de campo de grande aumento (x400) = 3.

Quadro 4 – Análise dos parâmetros inflamatórios com seus respectivos escores nos grupos de estudo

Nº	PMN			EDEMA			CONGESTÃO			MMN			TECIDO DE GRANULAÇÃO			FIBROSE			ESCORE*		
	C	I	A	C	I	A	C	I	A	C	I	A	C	I	A	C	I	A	C	I	A
1	-2	-1	-1	-1	-1	-3	-1	-2	-1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	-1	1	-2
2	-3	-2	-2	-1	-2	-2	-1	-1	-1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	-2	0	-2
3	-2	-3	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	1	1	1	1	2	1	1	3	1	-2	1	-2
4	-1	-3	-3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	-1	-2
5	-1	-1	-2	-1	-1	-1	-1	-1	-2	1	2	1	1	2	1	1	1	1	0	2	-2
6	-2	-3	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	-1	0	0
7	-2	-1	-1	-2	-2	-3	-1	-1	-2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	-1	1	-3
8	-1	-2	-2	-1	-2	-2	-1	-2	-2	1	1	1	1	1	1	1	1	2	0	-3	-2
9	-1	-1	-1	-1	-1	-2	-1	-1	-2	1	1	1	1	2	1	2	3	1	1	3	-2
10	-3	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	-1	-1	1
11	-2	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-1	-2	1	1	1	2	1	1	1	2	2	-1	0	-1
12	-2	-1		-1	-1		-1	-1		1	1		1	1		1	2		-1	1	
13	-2	-3		-2	-1		-2	-1		1	1		2	1		1	2		-2	-1	
14	-1			-1			-2			1			2			1			0		

NOTA: C = Controle; I = Isquemia; A = Azul.

Classificação do processo inflamatório: agudo acentuado (-3); agudo moderado (-2); agudo discreto (-1); crônico discreto (1); crônico moderado (2); crônico acentuado (3).

* Escore = soma dos escores dos parâmetros inflamatórios

Quadro 5 – Valores médios e análise estatística dos parâmetros inflamatórios para os grupos de estudo

DADOS	CONTROLE (n = 14)	ISQUEMIA (n = 13)	AZUL (n = 11)	VALOR DE p ⁽¹⁾
POLIMORFONUCLEAR	-1,79	-1,85	-1,73	0,972
EDEMA	-1,21	-1,31	-1,64	0,323
CONGESTÃO	-1,21	-1,23	-1,55	0,158
MONOMORFONUCLEAR	1,07	1,46	1,00	0,021*
TECIDO DE GRANULAÇÃO	1,21	1,54	1,09	0,044**
FIBROSE	1,21	1,62	1,27	0,272
ESCORE	-0,71	-1,54	0,23	0,006***

(1) Kruskal-Wallis.

(*) C x I: valor de p=0,052; C x A: valor de p=0,375; I x A: valor de p=0,024

(**) C x I: valor de p=0,087; C x A: valor de p=0,413; I x A: valor de p=0,023

(***) C x I: valor de p=0,0541; C x A: valor de p=0,034; I x A: valor de p=0,005

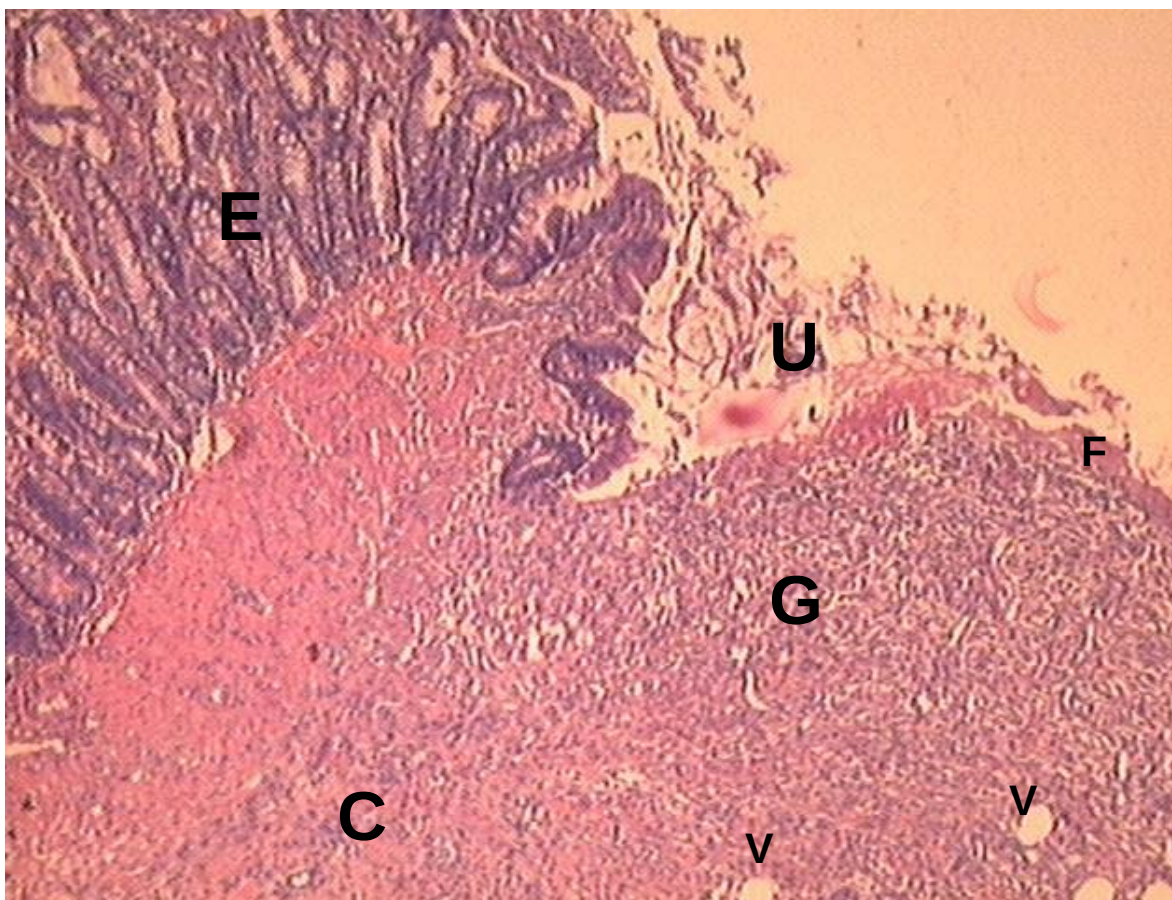
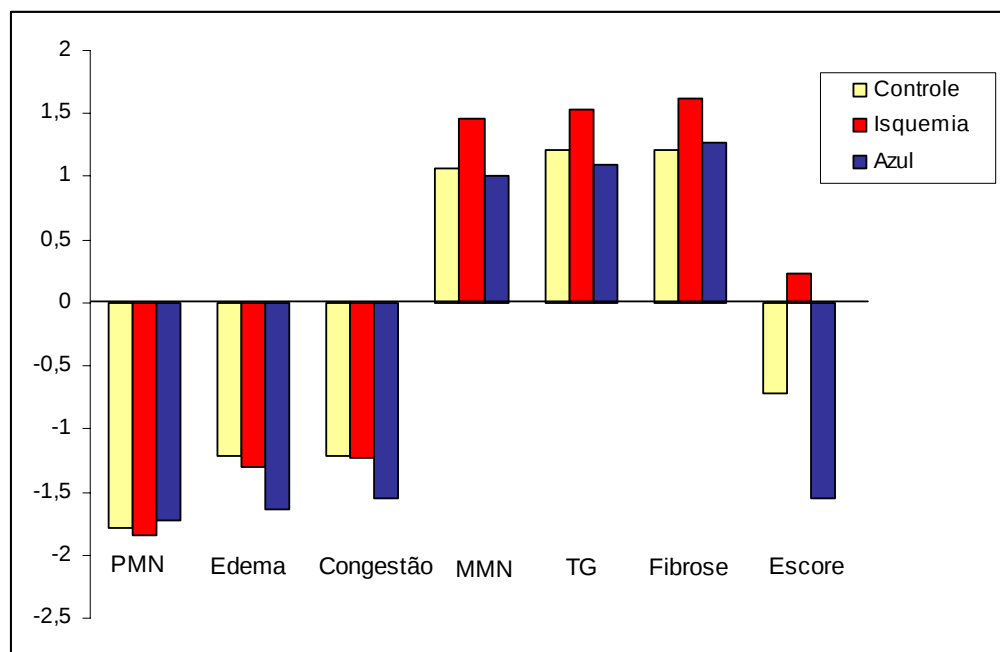


Figura 2 –Fotomicrografia com coloração pela hematoxilina-eosina (x40), onde se observa (canto superior esquerdo) o epitélio (E) do intestino delgado. No canto superior direito nota-se área ulcerada (U) com deposição de fibrina (F), recobrindo um tecido de granulação (G), com grande quantidade de vasos (V) e células inflamatórias. Abaixo da área de granulação há tecido conjuntivo (C) neoformado.

Figura 3 – Representação gráfica dos valores médios dos parâmetros inflamatórios para os grupos de estudo

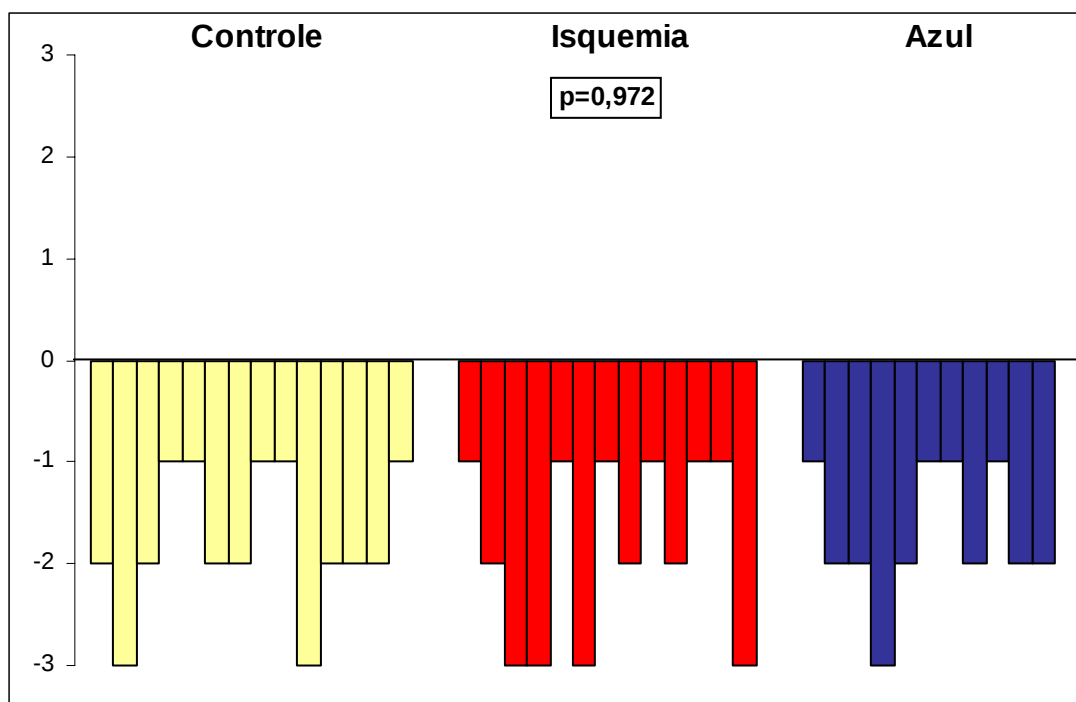


FONTE: Quadro 1

4.3.1.1 Células polimorfonucleares

Na avaliação das células polimorfonucleares (Quadros 6 e 7), comparando-se os três grupos simultaneamente, observou-se que tanto o grupo controle como o grupo com isquemia (sem e com uso do azul de metileno) apresentaram escore médio moderado, porém sem diferença significativa ($-1,79 \times -1,85 \times -1,73$) ($p=0,972$) (Gráfico 2).

Figura 4 - Representação gráfica do escore das células polimorfonucleares nos grupos de estudo

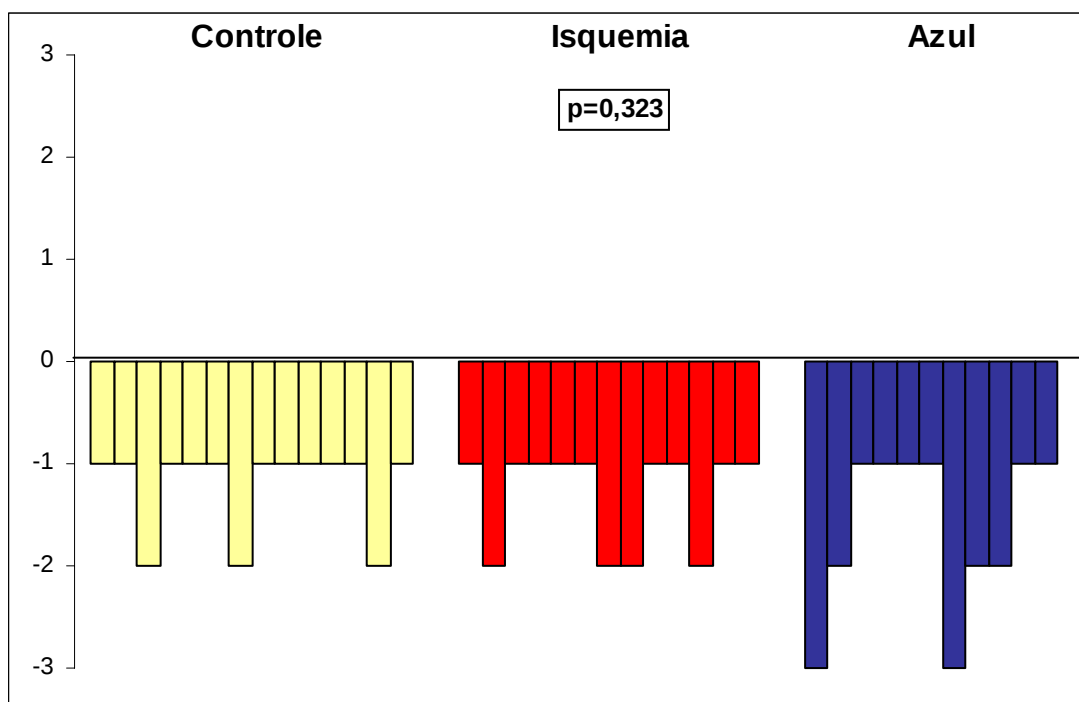


FONTE: Quadro 5

4.3.1.2 Edema

Na avaliação do edema (Quadros 6 e 7), comparando-se os três grupos simultaneamente, observou-se que tanto o grupo controle como o grupo com isquemia sem o uso do azul de metileno apresentaram escore médio de -1,21 e -1,31 (inflamação discreta), respectivamente, e o grupo de isquemia com o uso de azul de metileno apresentou escore de -1,64 (inflamação entre discreta e moderada). Mesmo sendo observado escore mais alto no grupo de isquemia com o uso de azul de metileno, não foi observada diferença significativa ($p=0,323$) (Gráfico 3).

Figura 5 - Representação gráfica do escore do edema nos grupos de estudo

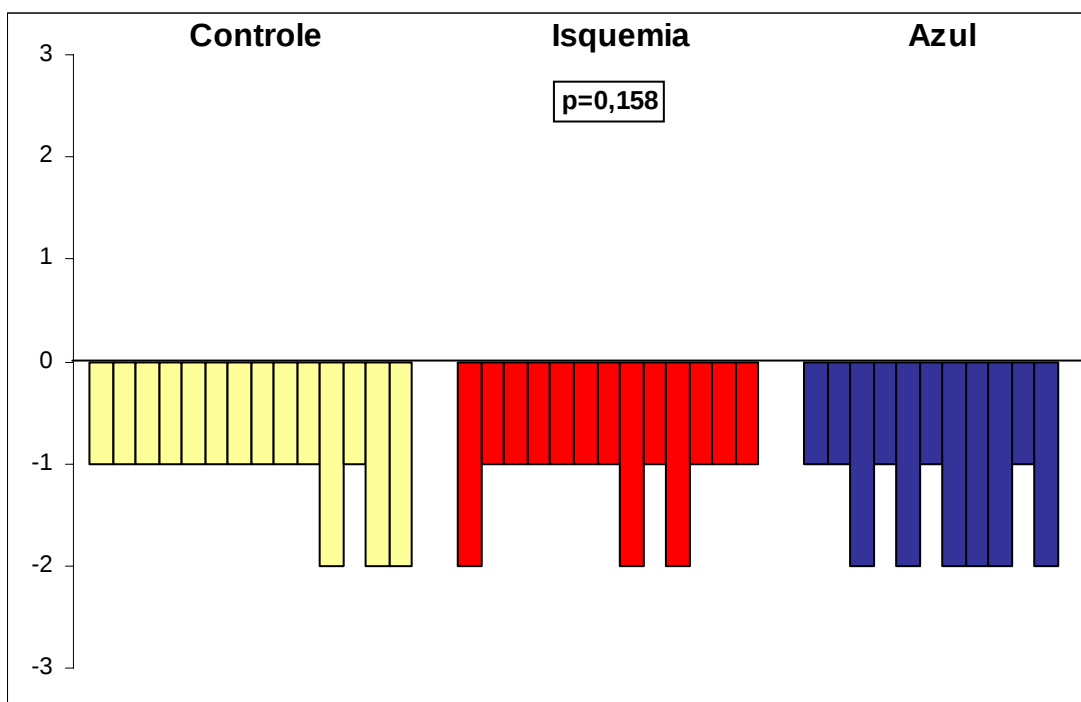


FONTE: Quadro 5

4.3.1.3 Congestão vascular

Na avaliação da congestão vascular (Quadros 6 e 7), comparando-se os três grupos simultaneamente, observou-se que tanto o grupo controle como o grupo com isquemia sem o uso do azul de metileno apresentaram escore médio de -1,21 e -1,23 (inflamação discreta), respectivamente, e o grupo de isquemia com o uso de azul de metileno apresentou escore de -1,55 (inflamação entre discreta e moderada). Mesmo sendo observado escore mais alto no grupo de isquemia com o uso de azul de metileno, não foi observada diferença significativa ($p=0,158$) (Gráfico 4).

Figura 6 - Representação gráfica do escore da congestão vascular nos grupos de estudo

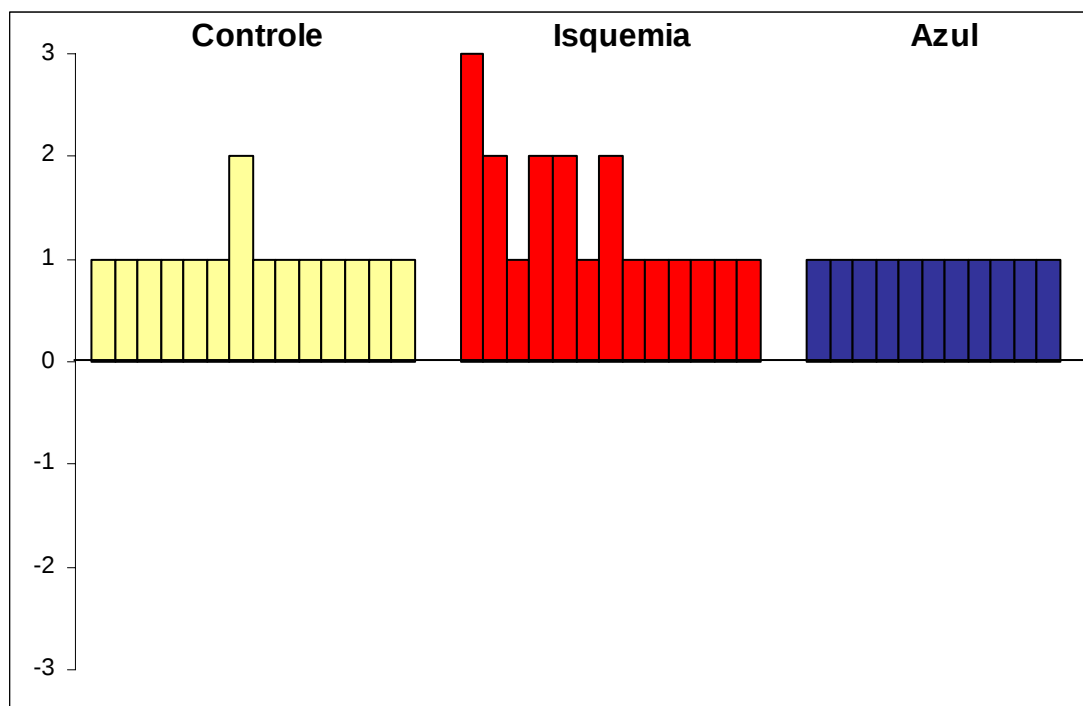


FONTE: Quadro 5

4.3.1.4 Células monomorfonucleares

Na avaliação das células polimorfonucleares (Quadros 6 e 7), comparando-se os três grupos simultaneamente, observou-se que tanto o grupo controle como o grupo com isquemia com o uso do azul de metileno apresentaram escore médio de +1,07 e +1,00 (inflamação discreta), respectivamente, e o grupo de isquemia sem o uso de azul de metileno apresentou escore de +1,46 (inflamação entre discreta e moderada). Foi observado escore mais alto no grupo de isquemia sem o uso de azul de metileno, demonstrando diferença significativa ($p=0,021$) (Gráfico 5).

Figura 7 - Representação gráfica do escore das células monomorfonucleares nos grupos de estudo

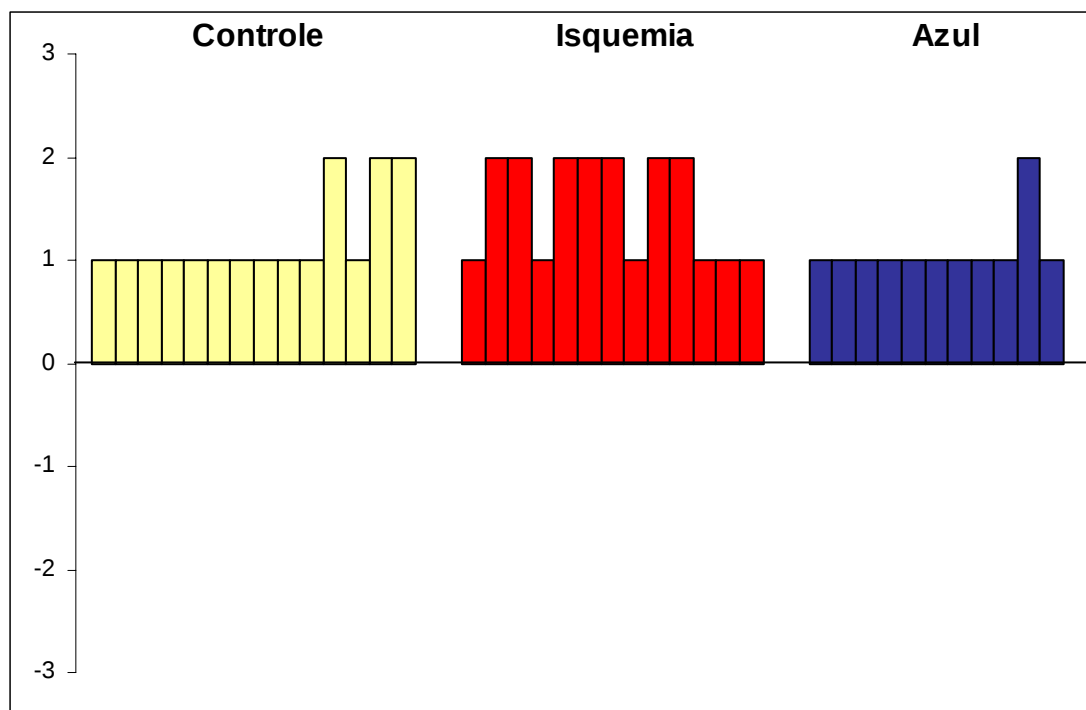


FONTE: Quadro 5

4.3.1.5 Tecido de granulação

Na avaliação do tecido de granulação (Quadros 6 e 7), comparando-se os três grupos simultaneamente, observou-se que tanto o grupo controle como o grupo com isquemia com o uso do azul de metileno apresentaram escore médio de +1,21 e +1,09 (inflamação discreta), respectivamente, e o grupo de isquemia sem o uso de azul de metileno apresentou escore de +1,54 (inflamação entre discreta e moderada). Foi observado escore mais alto no grupo de isquemia sem o uso de azul de metileno, demonstrando diferença significativa ($p=0,044$) (Gráfico 6).

Figura 8 - Representação gráfica do escore do tecido de granulação nos grupos de estudo

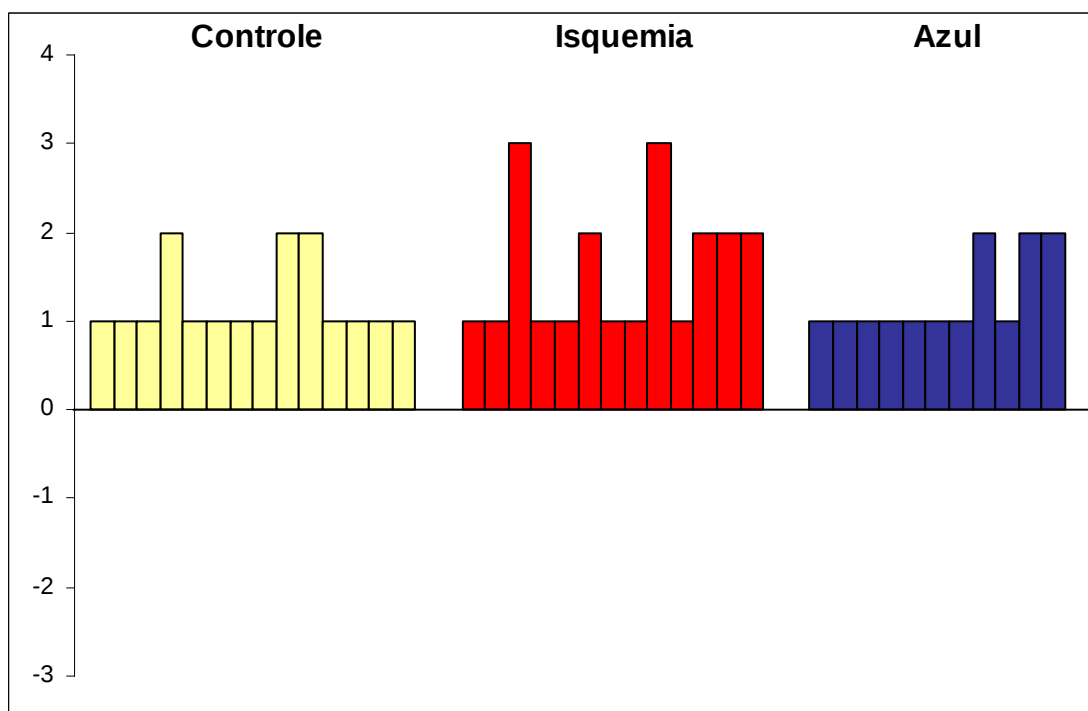


FONTE: Quadro 5

4.3.1.6 Fibrose

Na avaliação da fibrose (Quadros 6 e 7), comparando-se os três grupos simultaneamente, observou-se que tanto o grupo controle como o grupo com isquemia com o uso do azul de metileno apresentaram escore médio de +1,21 e +1,27 (inflamação discreta), respectivamente, e o grupo de isquemia sem o uso de azul de metileno apresentou escore de +1,62 (inflamação entre discreta e moderada). Foi observado escore mais alto no grupo de isquemia sem o uso de azul de metileno, porém sem diferença significativa ($p=0,272$) (Gráfico 7).

Figura 9 - Representação gráfica do escore da fibrose nos grupos de estudo



FONTE: Quadro 4

Os resultados detalhados do agrupamento dos escores são apresentados no Quadro 6, a seguir.

Quadro 6 – Avaliação microscópica nos grupos de estudo – Análise da inflamação

DADOS	CLASSE	CONTROLE (n = 14)		ISQUEMIA (n = 13)		AZUL (n = 11)		TOTAL (n = 38)	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
POLIMORFONUCLEAR									
• Discreta	-1	05	35,7	06	46,1	04	36,4	15	36,5
• Moderada	-2	07	50,0	03	23,1	06	54,5	16	42,1
• Acentuada	-3	02	14,3	04	30,8	01	9,1	07	18,4
EDEMA									
• Discreta	-1	11	78,6	09	69,2	06	54,5	26	68,4
• Moderada	-2	03	21,4	04	30,8	03	27,3	10	26,3
• Acentuada	-3	-	-	-	-	02	18,2	02	5,3
CONGESTÃO									
• Discreta	-1	11	78,6	10	76,9	05	45,5	26	68,4
• Moderada	-2	03	21,4	03	23,1	06	54,5	12	31,6
MONOMORFONUCLEAR									
• Discreta	1	13	92,9	08	61,5	11	100,0	32	84,2
• Moderada	2	01	7,1	04	30,8	-	-	05	13,2
• Acentuada	3	-	-	01	7,7	-	-	01	2,6
TECIDO DE GRANULAÇÃO									
• Discreta	1	11	78,6	06	46,2	10	90,9	27	71,1
• Moderada	2	03	21,4	07	53,8	01	9,1	11	28,9
FIBROSE									
• Discreta	1	11	78,6	07	53,8	08	72,7	26	68,4
• Moderada	2	03	21,4	04	30,8	03	27,3	10	26,3
• Acentuada	3	-	-	02	15,4	-	-	02	5,3

4.3.2 Avaliação do Colágeno

Na comparação simultânea dos três grupos, em relação ao colágeno do tipo I e colágeno do tipo III (Gráficos 8 e 9 e Quadro 7) não foi observada diferença significativa ($p=0,297$).

Figura 10 – Representação gráfica do colágeno tipo I nos grupos de estudo

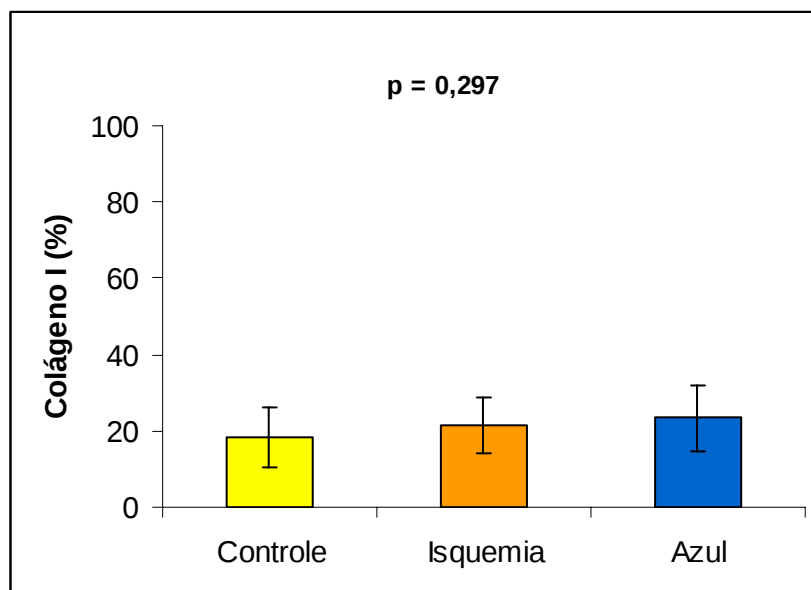
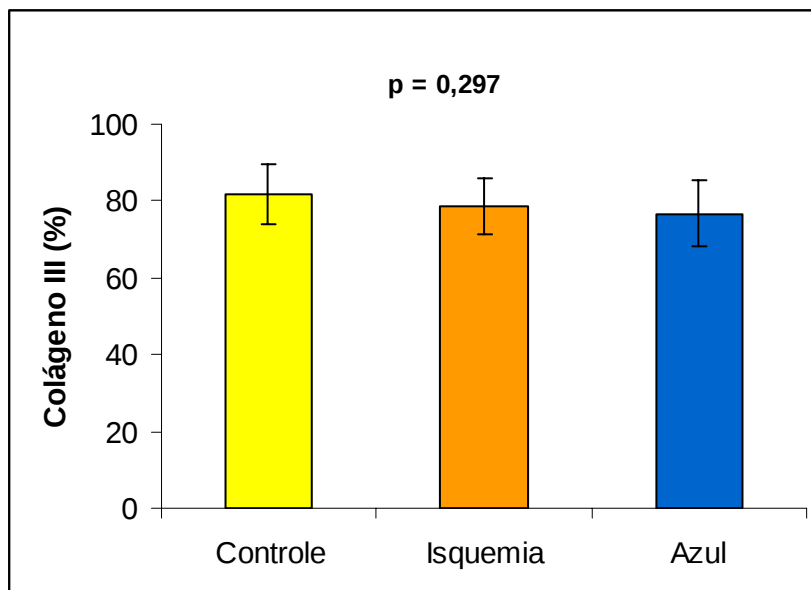


Figura 11 – Representação gráfica do colágeno tipo III nos grupos de estudo



FONTE: Quadro 1

Quadro 7 – Estatística descritiva do colágeno nos grupos de estudo

DADOS	Nº	MÉDIA	DESVIO PADRÃO	MÍNIMO	MÁXIMO	MEDIANA
COLÁGENO I	38	20,79	7,93	7,70	38,28	19,87
• Controle	14	18,20	7,85	7,70	37,49	17,70
• Isquemia	13	21,43	7,20	11,11	36,99	21,05
• Azul	11	23,32	8,54	14,67	38,28	23,78
COLÁGENO III	38	79,21	7,93	61,72	92,30	80,13
• Controle	14	81,80	7,85	62,51	92,30	82,30
• Isquemia	13	78,57	7,20	63,01	88,89	78,95
• Azul	11	76,68	8,54	61,72	85,33	76,22

Comparação dos grupos controle, isquemia e azul em relação ao colágeno I :
 Valor de $p=0,297$ (teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis)
 (o resultado é o mesmo para colágeno III, pois são valores complementares).



Figura 12 – Fotomicrografia de área de anastomose de animal do grupo azul de metileno (Picrus Sirius x 200), onde se observam áreas polarizadas com duas colorações. As áreas polarizadas em laranja/vermelho representam o colágeno tipo I. As áreas polarizadas em tons de verde/amarelo representam o colágeno tipo III. As áreas escuras ou não polarizadas representam estruturas não colagenizadas, como: vasos, células inflamatórias, músculo liso e epitélio.

5 DISCUSSÃO

Occlusion of the mesenteric vessels is apt to be regarded as one of those condition of witch(...)the diagnosis is impossible, the prognosis hopeless and the treatment almost useless.

Cokkinis AJ,1926, apud Boley et al.¹⁹⁰

A maneira pessimista expressada pelo autor na época reflete a gravidade da isquemia intestinal, de maneira a preocupar os profissionais envolvidos até nos dias atuais. Contudo, o progresso no entendimento da fisiopatologia, diagnóstico e tratamento possibilitou melhora no panorama geral da doença.

Mesmo com os avanços da medicina moderna, a taxa de mortalidade é elevada, variando de 60 a 100%, de acordo com a causa da isquemia e doenças associadas¹⁹¹.

A primeira descrição de uma oclusão vascular mesentérica, segundo Allbutt et al, em 1909 foi atribuída a Antonio Benivieni no final do século XV. Em 1815, Hogson reportou outro caso, seguido por Thiedman em 1843 Virchow em 1847 e 1854. Litten em 1875 publicou estudo experimental clássico a respeito dos efeitos da ligadura da artéria mesentérica superior. Contudo, a não ser pelo valor da descrição da ocorrência de gangrena intestinal, secundária à oclusão dos vasos mesentéricos, houve pouco progresso até 1895. Neste ano, Elliot descreveu o primeiro paciente a convalescer após ressecção de intestino infartado, provavelmente ocorrido por trombose venosa mesentérica. Criou dois estomas e os reanastomosou duas semanas após. Desta forma, o diagnóstico de gangrena intestinal por laparotomia e seu tratamento por ressecção e anastomose tem sido até os dias de hoje a principal sequência de abordagem dos pacientes portadores dessa enfermidade, apud Boley et al.¹⁹⁰.

No presente estudo, foi utilizado o rato como animal de experimentação por ser de baixo custo, de simples hospedagem, fácil de uniformizar a amostra e ter

ciclo de vida curto. Além disso, a distribuição do suprimento sangüíneo mesentérico é análoga à dos humanos ¹⁹.

Vários modelos de isquemia intestinal têm sido utilizados, com taxas de mortalidade que variam de 8% a 80%, nas oclusões da artéria mesentérica cranial, por períodos de um a 90 minutos ^{192-197,121,122,18,19}. Com relação à técnica de oclusão vascular utilizada neste estudo, inicialmente, realizou-se estudo piloto com 11 animais. Alguns animais foram submetidos à oclusão na emergência da artéria mesentérica cranial por sessenta minutos, com uso de microclampe vascular. Contudo, nenhum rato sobreviveu além do 2º dia de pós-operatório. Como o objetivo era atingir o sétimo dia de pós-operatório, optou-se, então, pela técnica de isquemia segmentar pelo tempo de 45 minutos, que permitiu a sobrevivência da maioria dos animais. Notou-se dificuldade com o instrumento cirúrgico usado na oclusão do vaso mesentérico, o qual provocava lesão local. Optou-se pela utilização de submucosa intestinal porcina na oclusão temporária do vaso, a qual mostrou-se eficaz na obstrução temporária do fluxo sangüíneo, sem lesar o vaso.

Megison et al. ¹⁹⁸ estudaram o valor da circulação colateral após oclusão da artéria mesentérica cranial e seus efeitos na severidade da lesão por isquemia. Questionaram a inconsistência de relação entre mortalidade e duração da oclusão arterial. Operaram grupos de ratos submetidos à oclusão da artéria mesentérica cranial e dos vasos colaterais. Com o clampeamento somente da artéria mesentérica cranial, ocorreu diminuição média de 83% do fluxo sangüíneo mesentérico, com variação individual de 44% a 97%. Na interrupção dos vasos colaterais associada, houve diminuição média de 97,8% do fluxo sangüíneo, com variação individual de 91 a 100%. Chegaram então à conclusão que: 1: oclusão isolada da artéria mesentérica cranial não reproduz isquemia e mortalidade e portanto não deve ser usada para estudos de isquemia mesentérica; 2: o fluxo mesentérico colateral é significativo, e é variável que torna os resultados inconsistentes quando a oclusão isolada da artéria mesentérica cranial é utilizada; 3: isquemia consistente e profunda é obtida quando os vasos colaterais são ocluídos em conjunto à artéria mesentérica cranial; 4: a técnica de oclusão da artéria mesentérica cranial em conjunto com os vasos colaterais leva a índices de

mortalidade que são proporcionais à duração da isquemia. No estudo piloto efetuado, não foi possível obter-se a sobrevivência dos animais expostos à oclusão da artéria mesentérica cranial na sua origem além de 24 horas de pós-operatório. No presente estudo, como o objetivo era avaliar o processo de cicatrização no sétimo dia de pós-operatório e não apenas a mortalidade, realizou-se, então, isquemia segmentar dos ramos da artéria mesentérica cranial, de modo a permitir a sobrevivência dos animais até a data prevista da eutanásia e a viabilizar o estudo.

Bergren et al.¹²², em seu estudo sobre o efeito dos varredores de radicais livres nas anastomoses intestinais após isquemia, também utilizaram clampeamento segmentar dos vasos mesentéricos, na extensão de 3 a 5cm. Concluíram que o uso da superóxido-dismutase como varredora de radicais livres, não promoveu alteração significativa no processo de cicatrização, mas que a mortalidade pós operatória foi igual ao grupo controle e menor que no grupo da isquemia sem tratamento.

Segundo Kuzu et al.¹⁹⁹, a isquemia e a reperfusão influenciam negativamente a cicatrização das anastomoses intestinais. Quando compararam a oclusão da artéria mesentérica cranial isolada, com outro grupo com oclusão associada dos vasos colaterais, não houve diferença significativa na cicatrização.

Com relação à presença de líquido livre no interior da cavidade abdominal dos ratos operados no presente estudo no momento da eutanásia, houve diferença estatisticamente significativa. O grupo controle apresentou maior quantidade, porém o líquido encontrado era incolor e inodoro. O objetivo da análise de tal parâmetro era verificar a presença de infecção na cavidade peritoneal, traduzida por líquido espesso, com grumos e aspecto purulento, o que não foi identificado.

Em nosso meio, Greca et al.¹⁷⁸ avaliaram o efeito do azul de metileno na prevenção da lesão pulmonar após isquemia-reperfusão intestinal. Utilizaram período de clampeamento de 60 minutos na artéria mesentérica cranial e azul de metileno intraperitoneal a 2%, na dose de 2 ml. A eutanásia ocorreu 4 horas após a reperfusão intestinal. A concentração do azul de metileno utilizada no presente

estudo foi de 0,5%, na quantidade de 2 ml intraperitoneal. Também por ocasião do estudo piloto, constatou-se que a concentração de azul de metileno a 2% e a 1% não foi suportada pelos animais, os quais não sobreviveram na sua maioria ao sétimo dia de pós-operatório.

Em virtude da complexidade do processo de cicatrização, para melhor entendimento, existe a divisão didática em três fases: inflamatória (3º e 4º dia), proliferativa (entre 7º e 10º dia) e maturação (variável, conforme a constituição tecidual) ²⁷. Optou-se, neste estudo, estudar a cicatrização com eutanásia dos animais no 7º dia de pós-operatório.

Na análise macroscópica das aderências perianastomóticas, o grupo de ratos operados submetidos à isquemia com uso de azul de metileno apresentou maior freqüência, com diferença estatística. A explicação para o achado pode ser pela interferência do azul de metileno no processo inflamatório no local da anastomose. A grande quantidade de aderências dificultou a dissecação e manutenção da integridade das alças intestinais a serem submetidas à análise da pressão de ruptura das anastomoses. Muitas peças rompiam-se no local da anastomose, o que impedia a realização do método. Outras peças não suportavam pressões mínimas quando submetidas ao método. Cada peça com estes problemas foi descartada, o que por fim não permitiu análise estatística.

A isquemia-reperfusão promove resposta sistêmica mediada principalmente por neutrófilos, citocinas e radicais livres de oxigênio ²⁵. Em nosso meio, Greca et al. ¹⁷⁸, ao estudarem os efeitos do azul de metileno na prevenção das lesões pulmonares decorrentes da isquemia-reperfusão, observaram menor seqüestração de neutrófilos na análise histológica e diminuição do edema pulmonar. No entanto, outro estudo de Greca et al., que ainda não foi publicado, avaliou a influência do azul de metileno na prevenção das lesões intestinais e renais após isquemia e reperfusão intestinal. Os autores concluíram, neste último estudo, que o azul de metileno não exerce nenhum papel protetor nos órgãos avaliados. Isto motivou à presente pesquisa, no intuito de avaliar se tais repercussões positivas poderiam ocorrer no local da anastomose intestinal. Na avaliação microscópica da inflamação no presente estudo, foram utilizados os seguintes parâmetros

inflamatórios: células polimorfonucleares, edema, congestão vascular, células monomorfonucleares, tecido de granulação e fibrose.

Com relação às células polimorfonucleares, na comparação entre os três grupos de estudo simultaneamente, observou-se escore de inflamação médio moderado, sem diferença estatisticamente significativa.

Na avaliação do edema, observou-se que no grupo de isquemia com uso de azul de metileno o escore foi mais alto (inflamação entre discreta e moderada), mas sem diferença estatisticamente significativa.

Na verificação da congestão vascular, o escore também foi mais alto no grupo de isquemia com uso de azul de metileno (inflamação discreta e moderada), mas também sem diferença significativa. É importante ressaltar que tanto a análise do escore da congestão vascular como do edema é subjetiva, o que caracteriza pouco peso na interpretação de tais resultados.

No que diz respeito à contagem das células monomorfonucleares, houve escore mais alto no grupo de isquemia sem o uso do azul de metileno (inflamação entre discreta e moderada), em relação aos outros grupos (inflamação discreta). Ressalta-se que o comportamento do grupo de isquemia com uso de azul de metileno foi semelhante ao grupo controle, o que poderia sugerir efeito benéfico do azul de metileno como quelante da reação inflamatória.

No caso da análise do tecido de granulação, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo de isquemia sem o uso de azul de metileno (inflamação entre discreta e moderada), quando comparado ao grupo isquemia com uso de azul de metileno e grupo controle (inflamação discreta), o que mantém o comportamento encontrado na análise dos monomorfonucleares.

Na análise da fibrose, quando comparados os grupos, observou-se o mesmo comportamento dos monomorfonucleares e do tecido de granulação, ou seja, escore mais alto no grupo de isquemia sem o uso de azul de metileno (inflamação entre discreta e moderada) em relação aos grupos isquemia com azul de metileno e grupo controle (inflamação discreta).

Com relação à concentração de colágeno, é sabido que os radicais livres de oxigênio decorrentes da isquemia-reperfusão levam a colagenólise ¹⁰⁷. Radicais

superóxido derivados dos neutrófilos na região da anastomose podem também contribuir para a colagenólise ^{107,200}. Tekin et al. ¹⁹⁷ avaliaram a concentração média de hidroxiprolina nas anastomoses de cólon de ratos submetidos à isquemia e reperfusão e concluíram que o uso de antitrombina III previne seus efeitos deletérios. O uso da antitrombina III leva a aumento significativo da concentração de colágeno, quando comparado ao grupo de ratos submetidos a isquemia, sem o uso da substância.

Biondo-Simões et al. ¹⁹⁶ avaliaram os efeitos da isquemia-reperfusão intestinal na cicatrização das anastomoses do intestino delgado. Foram comparadas as concentrações de colágeno no 3.º e no 7.º dias de pós-operatório. No 7.º dia de pós-operatório, o grupo controle teve maior concentração de colágeno total e o grupo com maior tempo de isquemia apresentou o menor valor de colágeno.

Em nosso estudo, na comparação entre os três grupos, não houve diferença significativa no nível de colágeno Tipo I e Tipo III.

6 CONCLUSÕES

Os dados obtidos, estudando-se a influência do azul de metileno nas anastomoses intestinais submetidas à isquemia e a reperfusão, permitem concluir:

- 1) Observou-se maior frequência de aderências perianastomóticas nos ratos submetidos à isquemia e ao uso do azul de metileno.
- 2) Em relação aos parâmetros inflamatórios e à análise da concentração e na maturação do colágeno, não foi possível afirmar efeito benéfico do azul de metileno nas anastomoses intestinais submetidas à isquemia e reperfusão.

7 REFERÊNCIAS

1. Kaleya RN, Boley SJ. Acute mesenteric ischaemia: an aggressive diagnostic and therapeutic approach. *Can J Surg.* 1992; 35(6): 613-23.
2. Corder AP, Taylor I. Acute mesenteric ischaemia. *Postgrad Med J.* 1993;69(807):1-3.
3. Grace PA, Da Costa M, Quereshi A, Sheehan S, Burke P, Bouchier-Hayes D. An aggressive approach to acute superior mesenteric arterial ischemia. *Eur J Vasc Surg.* 1993;7(6):731-2.
4. Ilhan H, Alatas O, Tokar B, Çolak O, Pasaoglu O, Koku N. Effects of the Anti-icam-1 monoclonal antibody, allopurinol, and methylene blue on intestinal reperfusion injury. *J Ped Surg.* 2003;38(11):1591-5.
5. Inderbitzi R, Wagner HE, Seiler C, Stinemann P, Gertsch. Acute mesenteric ischaemia. *Eur J Surg.* 1992; 158(2):123-6.
6. Kieny R. Surgical therapy of acute mesenteric occlusion. *Langenbecks Arch Chir Suppl II Verh Dtsch Ges Chir.* 1990; 303-9.
7. De Roos WK, Geelkerken RH, Van Bockel JH. Acute mesenteric embolism: an appeal for a pro-active diagnostic approach. *Neth J Surg.* 1990;42(4):110-2.
8. Atari E, Mitomi H, Kan T, Kusano S, Okudaira M. An experimental pathologic study of acute small intestinal ischaemic in mongrel dogs- occluded proximal site of anterior mesenteric artery by ballon catheter. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi.* 1992;89(8):1491-8.
9. Udassin R, Vromen A, Haskel Y. The time sequence of injury and recovery following transient reversible intestinal ischemia. *J Surg Res.* 1994; 56(3):221-5.
10. Kummerlen C, Seiler N, Galluser M et al. Polyamines and the recovery of intestinal morphology and function after ischemic damage in rats. *Digestion.* 1994;55(3):168-74.
11. Reinus JF, Brandt LJ, Boley SJ. Ischemic diseases of the bowel. *Gastroenterol Clin North Am.* 1990;19(2):319-43.
12. Zimmerman BL, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clinics North Am.* 1992; 72(1): 65-83.

13. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol.* 1986;250(6 pt 1):G749-53.
14. Galili Y, Bem-Abraham R, Weinbroum A, Marmur S, Laina A, Volman Y, Peer G, Szold O, Soffer D, Klausner J, Rabau M, Kluger Y. Methylene blue prevents pulmonary injury after intestinal ischemia-reperfusion. *J Trauma.* 1998;45(2);222-5.
15. Bray RC. Molybdenum iron-sulfur flavin hydrolases and related enzymes. In: *The enzymes* (ed. R.D. Boyer). Academic Press . 1975;12(3^a ed): 229-419.
16. Linch RE, Fridovich I. Effects of superoxid on the erythrocyte membrane. *J Biol Chem.* 1978; 253(6):1838-45.
17. McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic injury. *N Engl J Med.*1985;312(3): 159-63.
18. Demirogullari B, Sonmez K, Turkyimaz Z, Ekingen G, Dursun A, Bor V, Turkozkan N, Basaklar AC, Kale N. Comparision of consequent small bowel anastomoses after transient ischemia: an experimental study in rats. *J Pediatr Surg.* 1998;33(1): 91-3.
19. Kuzu MA, Koksoi C, Kale IT. Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. *Am J Surg.* 1998; 176(4): 348-51.
20. Gupta PC, Matsushita M, Oda K, Nishikimi N, Sakurai T, Nimura Y. Attenuation of renal ischemia-reperfusion injury in rats by allopurinol and prostaglandin e-1. *Eur Surg Res.* 1998;30(2):102-7.
21. Kakmaz M, Ozturk SH, Karaayvaz M, Guven C, Durak I. Enzymatic antioxidant defence mechanism in rat intestinal tissue is changed after ischemia-reperfusion. Effects of an allopurinol plus antioxidant combination. *Can J Surg.* 1999;42(6):427-31.
22. Albuquerque RG, Sanson Aj, Malangoni MA. Allopurinol protects enterocytes from hypoxia-induces apoptosis in vivo. *J Trauma.* 2002;53(3):415-21.
23. Kelner MJ, Bagnell R, Hale B, Alexander NM. Methylene blue competes with paraquat for reduction by flavo- enzymes resulting in decreased superoxide production in the presence of heme proteins. *Archf Biochem biophys.* 1988;262(2):422-6.
24. Salaris SC, Babbs CF, Voorhees WD. Methylene blue as an inhibitor of superoxide generation by xantine-oxidase: a potential new drug for the attenuation of ischemia/reperfusion injury. *Biochem Pharmacol.* 1991;42(3): 499-06.

25. Witte M, Barbul A. Repair of full-thickness bowel injury. *Crit Care Med.* 2003;31(8 suppl):S538-46.
26. Thornton FJ, Barbul A. Healing in the gastrointestinal tract. *Surg Clin North Am.* 1997;77(3):549-73.
27. Carrel A. The treatment of wounds. *JAMA.* 1910;55:2148-50.
28. Brasken P, Lehto M, Renvall S. Changes in the connective tissue composition of the submucosal layer of colonic anastomosis. An immunohistologic study in rats. *Acta Chir Scand.* 1989;155(8):413-9.
29. Brasken P. Healing of experimental colon anastomosis. *Eur J Surg Suppl* 1991;(566):1-51.
30. Herrmann JB, Woodward SC, Pulaski EJ. Healing of colonic anastomoses in the rat. *Surg Gynecol Obst.* 1964;119:269-75.
31. Meerson FZ, Kagan VE, Kozlov YP, Belkina LM, Arkhipenko YV. The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and the anti-oxidant protection of the heart. *Basic Res Cardiol.* 1982;77(5):465-85.
32. Haglund U, Lundgren O. Intestinal ischemia and shock factors. *Fed Proc.* 1978;37(13):2729-33.
33. Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine-desidrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol.* 1988;254(5, pt 1):G768-74.
34. Meneshian A, Bulkley GB. The physiology of endothelial xanthine oxidase: from urate catabolism to reperfusion injury to inflammatory signal transduction. *Microcirculation.* 2002;9(3):161-75.
35. Younes M, Schoenberg MH, Jung H, Fredholm BB, Haglund U, Schildberg FW. Oxidative tissue damage following regional intestinal ischemia and reperfusion in the cat. *Res Exp Med (Berl).* 1984;184(4):259-64.
36. Harrison R. Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now? *Free Rad Biol Med.* 2002;33(6):774-97.
37. Halliwell B, Gutteridge J. *Free radicals in biology and medicine*, 3rd ed. New York. Oxford University Press. 1999.
38. Ozel SK, Yuksel M, Haklar G, Durakbasa CU, Dagli TE, Aktan AO. Nitric oxide and endothelin relationship in intestinal ischemia/reperfusion injury (II). *Prostaglandins Leucot Essent Fatty Acids.* 2001; 64(4-5):253-7.

39. Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T: The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86(8): 2863-7.
40. Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T: A novel potent vaso-constrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. 1988; 332(6163): 411-5.
41. Tsuruma T, Yagihashi A, Matsuno T, Zou XM, Asanuma K, Sasaki K, Hirata K. The heat shock protein 70 family reduces ischemia/reperfusion injury in small intestine. *Transplant Proc*. 1996;28(5):2629-30.
42. Hotchkiss R, Nunnally I, Lindquist S, Taulien J, Perdrizet G, Karl I: Hyperthermia protects mice against the lethal effects of endotoxin. *Am J Physiol*. 1993; 265(6, Pt 2): R1447-57.
43. Ryan AJ, Flanagan SW, Moseley PL, Gisolfi CV: Acute heat stress protects rats against endotoxin shock. *J Appl Physiol*. 1992; 73(4): 1517-22.
44. Fleming SD, Starnes BW, Kiang JG, Stojadinovic A, Tsokos GC, Shear-Donohue T: Heat stress protection against mesenteric I/R-induced alterations intestinal mucosa in rats. *J appl Physiol*. 2002; 92(6): 2600-7.
45. Stojadinovic A, Kiang J, Smallridge R, Galloway R, Shear-Donohue T. Induction of heat shock protein 72 protects against ischemia/reperfusion in rat small intestine. *Gastroenterology*. 1995;109(2):505-15.
46. Tsuruma T, Yagihashi A, Watanabe N, Yajima T, Kameshima H, Araya J, Hirata K: Heat-shock protein-73 protects against small intestinal warm ischemia-reperfusion injury in the rat. *Surgery*. 1999; 125(4): 385-95.
47. Hayward R, Lefer AM. Time course of endothelial-neutrophil interaction in splenic artery ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*. 1998;275(6,pt2):H2080-86.
48. Hierholzer C, Kalff JC, Audolfsson G, Billiar TR, Tweardy DJ, Bauer AJ. Molecular and functional contractile sequelae of rat intestinal ischemia/reperfusion injury. *Transplantation*. 1999;68(9):1244-54.
49. Cooper D, Russell J, Chitman KD, Williams MC, Wolf RE, Granger DN. Leucocyte dependence of platelet adhesion in postcapillary venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(5):H1895-900.
50. Mbachu EM, Klein LV, Rubin BB, Lindsay TF. A monoclonal antibody against cytokine-induced neutrophil chemoattractant attenuates injury of small intestine in a model of ruptured abdominal aortic aneurysm. *J Vasc Surg*. 2004;39(5):1104-11.

51. Massberg S, Gonzalez AP, Leiderer R, Menger MD, Messmer K. In vivo assessment of the influence of cold preservation time on microvascular reperfusion injury after experimental small bowel transplantation. *Br J Surg.*1998;85(1):127-33.
52. Sisley AC, Desai T, Harig JM, Gewertz BL, Neutrophil depletion attenuates human intestinal reperfusion injury. *J Surg Res.* 1994; 57(1): 192-6.
53. Granger DN, Korthuis RJ: Physiologic mechanisms of postischemic tissue injury. *Annu Rev Physiol.* 1995; 57: 311-32.
54. Naito Y, Takagi T, Uchiyama K, Handa O, Tomatsuri N, Imamoto E, Kokura S, Ichikawa H, Yoshida N, Yoshikawa T: Suppression of intestinal ischemia-reperfusion injury by a specific peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, pioglitazone, in rats. *Redox Rep.* 2002; 7(5): 294-9.
55. Grisham MB, Granger DN, Lefer DJ: Modulation of leukocyte-endothelial interactions by reactive metabolites of oxygen and nitrogen: Relevance to ischemic heart disease. *Free Radic Biol Med.* 1998; 25(4-5): 404-33.
56. Granger DN, Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol.* 1988; 255(6, Pt 2): H 1269-75.
57. Panes J, Perry M, Granger DN: Leukocyte-endothelial cell adhesion: Avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol.* 1999; 126(3): 537-50.
58. Riaz AA, Wan MX, Schafer T, Schramm R, Ekberg H, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H: Fundamental and distinct roles of P-selectin and LFA-1 in ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelium interactions in the mouse colon. *Ann Surg.* 2002; 236(6): 777-84.
59. Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ: Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence. *Circ Res.* 1990; 66(5): 1436-44.
60. Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.* 1989; 320(6): 365-76.
61. Bagge U, Amundson B, Lauritzen C: White blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock. *Acta Physiol Scand.* 1980; 108(2): 159-63.
62. Nalini S, Mathan MM, Balasubramanian KA: Oxygen free radical induced damage during intestinal ischemia/reperfusion in normal and xanthine oxidase deficient rats. *Mol Cell Biochem.* 1993; 124(1): 59-66.

63. Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H: Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol.* 2003; 199(1): 8-17.
64. Qu XW, Wang H, De Plaen IG, Rozenfeld EA, Hsueh W. Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates the expression of inducible NOS in rat small intestine via modulation of nuclear factor kappa. *B Faseb J.* 2001;15(2):439-46.
65. Hasan K, Heesen BJ, Corbett JÁ, McDaniel ML, Chang K, Allison W, Wolffenbuttel BH, Williamson JR, Tilton RG: Inhibition of nitric oxide formation by guanidines. *Eur J Pharmacol.* 1993; 249(1): 101-6.
66. Naka M, Nanbu T, Kobayashi K, Kamanaka Y, Komeno M, Yanase R, Fukutomi T, Fujimura S, Seo HG, Fujiwara N, Ohuchida S, Suzuki K, Kondo K, Taniguchi N: A potent inhibitor of inducible nitric oxide synthase, ONO-1714, a cyclic amidine derivative. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 270(2): 663-7.
67. Salzman AL. Nitric oxide in the gut. *New Horiz.* 1995;3(2):352-64.
68. Kubes P, McCafferty DM. Nitric oxide and intestinal inflammation. *Am J Med.* 2000;109(2):150-8.
69. Suzuki Y, Deitch EA, Mishima S. Lu Q, Xu D: Inducible nitric oxide synthase gene knockout mice have increased resistance to gut injury and bacterial translocation after an intestinal ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med.* 2000; 28(11): 3692-6.
70. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Caputti AP: Role of constitutive nitric oxide synthase and peroxynitrite production in a rat model of splanchnic artery occlusion shock. *Life Sci.* 1998; 63(9): 789-99.
71. Wu B, Iwakiri R, Tsunada S, Utsumi H, Kojima M, Fujise T, Ootani A, Fujimoto K: iNOS enhances rat intestinal apoptosis after ischemia-reperfusion. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33(5): 649-58.
72. Virlos IT, Inglott FS, Williamson RC, Mathie RT: Differential expression of pulmonary nitric oxide synthase isoforms after intestinal ischemia-reperfusion. *Hepatology.* 2003; 50(49): 31-6.
73. Wink DA, Hanbauer I, Krishna MC, DeGraff W, Gamson J, Mitchell JB: Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90(21): 9813-7.
74. Kosonen O, Kankaanranta H, Malo-Ranta U, Moilanen E: Nitric oxide-releasing compounds inhibit neutrophil adhesion to endothelial cells. *Eur J Pharmacol.* 1999; 382(2): 111-7.

75. Gidday JM, Park TS, Shah AR, Gonzales ER: Modulation of basal and postischemic leukocyte-endothelial adherence by nitric oxide. *Stroke*. 1998; 29(7): 1423-9.
76. Guo JP, Murohara T, Buerke M, Scalia R, Lefer AM: Direct measurement of nitric oxide release from vascular endothelial cells. *J Appl Physiol*. 1996; 81(2): 774-9.
77. Lefer AM, Lefer DJ: The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res*. 1996; 32(4): 743-51.
78. Wink DA, Mitchell JB: Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*. 1998; 25(4-5): 434-56.
79. Gauthier TW, Davenpeck KI, Lefer AM: Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*. 1994; 267(4, Pt 1): G 562-8.
80. Ito K, Ozasa H, Kojima N, Miura M, Iwa T, Senoo H, Horikawa S: Pharmacological preconditioning protects lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rat. *Schock*. 2003;19(5):462-8.
81. Attuwaybi BO, Kozar RA, Moore-Olufemi SD, Sato N, Hassoun HT, Weisbrodt NW, Moore FA: Heme oxygenase-1 induction by hemim protects against gut ischemia/reperfusion injury. *J Surg res*. 2004;118(1):53-7
82. Nakao A, Kimizuka K, Stolz DB, Neto JS, Kaizu T, Choi AM, Uchiyama T, Zuckerbraun BS, Nalesnik MA, Otterbein LE, Murase N: Carbon monoxide inhalation protects rat intestinal grafts from ischemia/reperfusion injury. *Am J Pathol*. 2003; 163(4): 1587-98.
83. Squiers Ec, Bruch D, Buelow R, Tice DG: Pretreatment of small bowel isograft donors with cobalt-protoporphyrin decreases preservation injury. *Transplant Proc*. 1999; 31(1-2): 585-6.
84. Choi AM, Alam J. Heme oxygenase-1: Function, regulation and implication of a novel stress inducible protein in oxidant induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1996;15(1):9-19.
85. Katori M, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW: Heme oxygenase-1 system in organ transplantation. *Transplantation*. 2002;74(7):905-12.

86. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer NA, Ames BN: Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*. 1987; 235(4792): 1043-6.
87. Balla G, Jacob HS, Balla J, Rosenberg M, Nath K, Apple F, Eaton JW, Vercellotti GM: Ferritin: a cytoprotective antioxidant strategem of endothelium. *J Biol Chem*. 1992; 267(25): 18148-53.
88. Willis D, Moore AR, Frederick R, Willoughby DA: Heme oxygenase: A novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med*. 1996; 2(1): 87-90.
89. Vachharajani TJ, Work J, Issekutz AC, Granger DN: Heme oxygenase modulates selectin expression in different regional vascular beds. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000; 278(5): H 1613-7.
90. Coito AJ, Buelow R, Shen XD, Amersi F, Moore C, Volk HD, Busuttil RW, Kupiec-Weglinski JW: Heme oxygenase-1 gene transfer inhibits inducible nitric oxide synthase expression and protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia-reperfusion injury. *Transplantation*. 2002; 74(1): 96-102.
91. Ceran C, Sonmez K, Turkyilmaz Z, Demirogullari B, Dursun A, Duzgun E, Basaklar AC, Kale N: Effect of bilirubin in ischemia/reperfusion injury on rat small intestine. *J Pediatr Surg*. 2001; 36(12): 1764-7.
92. Hammerman C, Goldschmidt D, Caplan MS, Kaplan M, Bromiker R, Eidelman AI, Gartner LM, Hochman A: Protective effect of bilirubin in ischemia-reperfusion injury in the rat intestine. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2002; 35(3): 344-9.
93. Anaya-Prado R, Toledo-Preyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res*. 2002;105(2):248-58.
94. Zingarelli B, Sheehan M, Wong HR: Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med*. 2003; 31(Suppl 1): S105-11.
95. Siebenlist U, Franzoso G, Brown K: Structure, regulation and function of NF-kappa B. *Annu Rev Cell Biol*. 1994; 10: 405-55.
96. Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T: Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J*. 1995; 9(10): 899-909.
97. Barnes PJ: Nuclear factor-kappa B: *Int J Biochem Cell Biol*. 1997; 29(6): 867-70.

98. Blackwell TS, Christman JW: The role of nuclear factor-kappa B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997; 17(1): 3-9.
99. Spiecker M, Darius H, Kaboth K, Hubner, F, Liao JK: Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. *J Leukoc Biol.* 1998; 63(6): 732-9.
100. Peng HB, Libby P, Liao JK: Induction and stabilization of I kappa B alpha by nitric oxide mediates inhibition of NF-kappa B. *J Biol Chem.* 1995; 270(23): 14214-9.
101. Austen Jr WG, Kobzik L, Carrol MC, Hechtman HB, Moore Jr FD. The role of complement and natural antibody in intestinal ischemia-reperfusion injury. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2003;16(1):1-8.
102. Heller T, Hennecke M, Baumann U, Gessner JE, zu Vilsendorf AM, Baensch M, Boulay F, Kola A, Klos A, Bautsch W, Kohl J. Selection of a C5a receptor antagonist from phage libraries attenuating the inflammatory response in immune complex disease and ischemia/reperfusion injury. *J Immunol.* 1999;163(2):985-94.
103. Kimura T, Andoh A, Fujiyama Y, saotome T, Bamba T. A blockade of complement activation prevents rapid ischemia-reperfusion injury by modulating mucosal mast cell degranulation in rats. *Clin Exp Immunol.* 1998;11(3):484-90.
104. Wada K, Montalto MC, Stahl GL. Inhibition of complement C5 reduces local and remote organ injury after intestinal ischemia/reperfusion in the rat. *Gastroenterology.* 2001;120(1):126-33.
105. Gibbs As, Weiser MR, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB: P-selectin mediates intestinal ischemic injury by enhancing complement deposition. *Surgery.* 1996; 119(6): 652-6.
106. Montalto MC, Hart ML, Jordan JE, Wada K, Stahl GL: Role for complement in mediating intestinal nitric-oxide synthase-2 and superoxide dismutase expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003; 285(1): G197-206.
107. Hernandez LA, Grisham MD, Granger DN. A role for iron in oxidant-mediated ischemic injury to intestinal microvasculature. *Am J Physiol.* 1987;253(1,pt 1):G49-53.
108. Lelli Jr JL, Pradhan S, Cobb LM. Prevention of postischemic injury in immature intestine by deferoxamine. *J Surg Res.* 1993;54(1):34-8.

109. Mc Cord JM, Fridovich I. The reduction of cytochrome c by milk xantine oxidase. *J Biol Chem.* 1968;243(21):5753-60.
110. Roy RS, Mc Cord JM. Superoxide and ischemia: conversion of xantine desidrogenase to xantine-oxidase. In: Grenwald R, Cohen G, eds. *Oxy radicals and their scavengers systems. Vol2. Cellular and molecular aspects.* New York. Elsevier Science. 1983:145-53.
111. Sackler MI. Xanthine oxidase from liver and duodenum of the rat: histochemical localization and eletrophoretic heterogeneity. *J Histochem Cytochem.* 1966;14(4):326-33.
112. Jarasch ED, Bruder G, Heid HW. Significance of xantine oxidase in capillary endotelial cells. *Acta Physiol Scand Suppl.* 1986;548:39-46.
113. Poggetti RS, Moore FA, Koike K, Banerjee A. Simultaneous liver and lung injury following gut ischemia is mediated by xantine-oxidase. *J trauma.* 1992;32(6):723-8.
114. Auscher C, Amory N, Emp P, et al. Xantine oxidase activity in human intestines: histochemical and radiochemical study. *Adv Exp Med Biol.* 1979;122B:197-01.
115. Phan SH, Gannan DE, Varani T, et al. Xantine oxidase acitivity in rat pulmonary artery endothelial cels and its alteration by activated neutrophils. *Am J Patol.* 1989;134(6):1201-11.
116. Hakgüder G, Akgür FM, Ates O, Olguner M, Aktug T, Ozer E. Short-term intestinal ischemia-reperfusion alters intestinal motility that can be preserved by xantine oxidase inhibition. *Dig Dis Sci.* 2002;47(6):1279-83.
117. Oktar BK, Coscun T, Bozkurt A, Yegen BC, Yuksel M, Haklar G, Bilsel S, Aksungar FB, Cetinel U, Granger DN, Kurtel H. Endothelin-1- induced PMN infiltration and mucosal dysfunction in the rat small intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Phisiol.* 2000; 279(3):G483-91.
118. Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med.* 1993;21(9):1376-86.
119. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *Br j Surg.* 1994;81(5):637-47.
120. Lucchesi BR. Complements, neutrophils and free radicals: mediators of reperfusion injury. *Drug Res.* 1994;44:420-31.

121. Ponsky J, Mc Collister DM, Aszodi A, Grzonka R, Lee Ponsky. Effects of transient ischemia on the healing small bowel anastomosis. *Am. Surg.* 1988;54(8):517-8.
122. Bergren CT, Bodzin JH, Cortez JA. Improved survival using oxygen free radical scavengers in the presence of ischemic bowel anastomosis. *Am Surg.* 1988;54(6):333-6.
123. Richard V, Kaeffer N, Tron C, Thuillez C: Ischemic preconditioning protects against coronary endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion. *Circulation.* 1994; 89(3): 1254-61.
124. Murry CE, Jennings RB, Reiner KA: Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemia myocardium. *Circulation.* 1986; 74(5): 1124-36.
125. Koti RS, Seifalian AM, McBride AG, Yang W, Davidson BR: The relationship of hepatic tissue oxygenation with nitric oxide metabolism in ischemic preconditioning of the liver. *FASEB J.* 2002; 16(12): 1654-6.
126. Pang CY, Neligan P, Zhong A, He W, Xu H, Forrest CR: Effector mechanism of adenosine in acute ischemic preconditioning of skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol.* 1997; 273(3, Pt 2): R887-95.
127. Glazier SS, O'Rourke DM, Graham DI, Welsh FA: Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1994; 14(4): 545-53.
128. Sakurai M, Hayashi T, Abe K, Aoki M, Sadahiro M, Tabayashi K: Enhancement of heat shock protein expression after transient ischemia in the preconditioned spinal cord of rabbits. *J Vasc Surg.* 1998; 27(4): 720-5.
129. Turman MA, Bates CM: Susceptibility of human proximal tubular cells to hypoxia: effect of hypoxic preconditioning and comparison to glomerular cells. *Ren Fail.* 1997; 19(1): 47-60.
130. Du ZY, Hicks M, Winlaw D, Spratt P, Macdonald P: Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat. *J Heart Lung Transplant.* 1996; 15(12): 1258-67.
131. Li Y, Roth S, Laser M, MaJX, Crosson CE: Retinal preconditioning and the induction of heat-shock protein 27. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003; 44 (3): 1299-304.
132. Aksoyek S, Cinel I, Avlan D, Cinel L, Ozturk Cgurbuz P, Nayci A, Oral U. Intestinal ischemic preconditioning protects the intestine and reduces bacterial translocation. *Schok.* 2002;18(5):476-80

133. Sola A, De Oca J, Gonzales R, Prats N, Rosello-Catafau J, Gelpi E, Jaurieta E, Hotter G: Protective effect of ischemic preconditioning on cold preservation and reperfusion injury associated with rat intestinal transplantation. *Ann Surg.*2001; 234(1): 98-106.
134. Davis JM, Gute DC, Jones S, Krsmanovic A, Korthuis RJ: Ischemic preconditioning prevents postischemic P-selectin expression in the rat small intestine. *Am J Physiol.* 1999; 277(6, Pt 2): H2476-81.
135. Vlasov TD, Smirnov DA, Nutfulina GM: Preconditioning of the small intestine to ischemia in rats. *Neurosci Behav Physiol.* 2002; 32(4): 449-53.
136. Hotter G, Closa D, Prados M, Fernandez-Cruz L, Prats N, Gelpi E, Rosello-Catafau J: Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996; 222(1): 27-32.
137. Ferencz A, Szanto Z, Kalmar-Nagy K, Horvath OP, Roth E: Mitigation of oxidative injury by classic and delayed ischemic preconditioning prior to small bowel autotransplantation. *Transplant Proc.* 2004; 36(2): 286-8.
138. Kawata K, Takeyoshi I, Iwanami K, Sunose Y, Aiba M, Ohwada S, Matsumoto K, Morishita Y. A spontaneous nitric oxide ameliorates small bowel ischemia-reperfusion injury in dogs. *Dig Dis Sci.* 2001;46(8):1748-56.
139. Aoki N, Johnson G, III, Lefer AM. Beneficial effects of two forms of NO administration in feline splanchnic artery occlusion shock. *Am J Physiol.* 1990;258(2, pt 1):G275-281.
140. Fox-Robichaud A, Payne D, Hasan SU, Ostrovsky L, Fairhead T, Reinhardt P, Kubes P: Inhaled NO as a viable antiadhesive therapy for ischemia/reperfusion injury of distal microvascular beds. *J Clin Invest.* 1998; 101(11): 2497-505.
141. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001;94(6):1133-38.
142. Souza DG, Coutinho SF, Silveira MR, Cara Dc, Teixeira MM. Effects of a BLT receptor antagonist on local and remote reperfusion injuries after transient ischemia of the superior mesenteric artery in rat. *Eur J Pharmacol.*2000;403(1-2):121-28.
143. Souza DG, Cara DC, Cassali GD, Coutinho SF, Silveira MR, Andrade Sp, Poole SP, Teixeira MM. Effects of the PAF receptor antagonist UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischemia of the superior mesenteric artery in the rat. *Br J Pharmacol.* 2000;131(8):1800-08.

144. Sun Z, Olanders K, Lasson A, Dib M, Annborn M, Andersson K, Wang X, Andersson R. Effective treatment of gut barrier dysfunction using an antioxidant, a PAF inhibitor, and monoclonal antibodies against the adhesion molecule PECAM-1. *J Surg Res.* 2002;105(2):220-33.
145. Souza DG, Cassali DG, Poole S, Teixeira MM. Effects of inhibition of PDE4 and TNF-alpha on local and remote injuries following ischemia and reperfusion injury. *Br J Pharmacol.* 2001;134(5):985-94.
146. Zou L, Attuwaybi B, Kone Bc. Effects of NF-kappa B inhibition on mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284(4):G713-21.
147. Hassoun HT, Zou L, Moore FA, Kozar RA, Weibrodt NW, Kone BC. Alpha-melanocyte stimulating hormone protects against mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liveer Physiol.* 202;282(6):G1059-68.
148. Riaz AA, Wan MX, Schafer T, Dawson P, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Allopurinol and superoxide dismutase protect against leucocyte-endothelium interactions in a novel model of colonic ischaemia-reperfusion. *Br J Surg.* 2002;89(12):1572-80.
149. Harris NR, Granger DN. Organ procurements and preservation for transplantation. In: ischemia/reprfusion injury. New York: Springer Verlag. 1997:67-81.
150. O'Donnell KA, Caty MG, Zheng S. Rossman JE, Azizkhan RG: Oxygenated intraluminal perfluorocarbon protects intestinal mucosa from ischemia/reperfusion injury. *J Pediatr Surg.* 1997; 32(2): 361-65.
151. Fukatsu K, Zarzaur BL, Johnson CD, Lundberg AH, Wilcox HG, Kudsk KA: Enteral nutrition prevents remote organ injury and death after a gut ischemic insult. *Ann Surg.* 2001: 233(5): 660-8.
152. Fukatsu K, Lundberg AH, Hanna MK, Wu Y, Wilcox HG, Granger DN, Gaber AO, Kudsk KA: Increased expression of intestinal P-selectin and pulmonary E-selectin during intravenous total parenteral nutrition. *Arch Surg.* 2000: 135(10): 1177-82.
153. Wu Y, Kudsk KA, De Witt RC, Tolley EA, Li J: Route and type of nutrition influence IgA-mediating intestinal cytokines. *Ann Surg.* 1999; 229(5): 662-7.
154. Lacey JM and Wilmore DW: Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutr Rev.* 1990; 48(8): 297-309.

155. Askanazi J, Carpentier YA, Michelsen CB, Elwyn DH, Furst P, Kantrowitz LR, Gump FE, Kinney JM: Muscle and plasma amino acids following injury. Influence of intercurrent infection. *Ann Surg.* 1980; 192(1): 78-85.
156. Wilmore DW: Growth factors and nutrients in the short bowel syndrome. *JPEN J Parenter Enteral Nutr .* 1999; 23(Suppl 5): S117-20.
157. Ziegler TR, Estivariz CF, Jonas CR, Gu LH, Jones DP, Leader LM: Interactions between nutrients and peptide growth factors in intestinal growth, repair, and function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr .* 1999; 23(Suppl 6): S174-83.
158. Zhang W, Bain A, Rombeau JL: Insulin-like growth factor-1 (IGF-1_ and glutamine improve structure and function in the small bowel allograft. *J Surg Res.* 1995; 59(1): 6-12.
159. Ikeda S, Zarzaur BL, Johnson CD, Fukatsu K, Kudsk KA: Total parenteral nutrition supplementation with glutamine improves survival after gut ischemia/reperfusion. *JPEN J Parenter Enteral Nutr .* 2002; 26(3): 169-173.
160. Iijima S, Shou J, Naama H, Calvano SE, Daly JM: Beneficial effect of enteral glycine in intestinal ischemia/reperfusion injury. *J Gastrointest Surg.* 1997;1(1):53-60.
161. Lee Ma, McCauley RD, Kong SE, Hall JC: Pretreatment with glycine reduces the severity of warm intestinal ischemic/reperfusion injury in the rat. *Ann Plast Surg.* 2001; 46(3): 320-6.
162. Lee Ma, McCauley RD, Kong SE, Hall JC: Influence of glycine on intestinal ischemic/reperfusion injury. *JPEN J Parenter Enteral Nutr .* 2002; 26(2): 130-5.
163. Grotz MR, Pape HC, van Griensven M, Stalp M, Rohde F, Bock D, Krettek C: Glycine reduces the inflammatory response and organ damage in a two-hit sepsis model in rats. *Shock.* 2001; 16(2): 116-21.
164. Kelly D, Zhong Z, Wheeler MD, Li X, Froh M, Schemmer P, Yin M, Bunzendaul H, Bradford B, Lemasters JJ: L-Glycine: A novel antiinflammatory, immunomodulatory, and cytoprotective agent. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 2003; 6(2): 229-40.
165. Ferrer JV, Ariceta J, Guerrero D, Gomis T, Larrea MM, Balen E, Lera JM: Allopurinol and N-acetylcysteine avoid 60% of intestinal necrosis in an ischemia-reperfusion experimental model. *Transplant Proc.* 1998; 30(6): 2672.
166. Ozden A, Tetik C, Bilgihan A, Calli N, Bostanci B, Yis O, Duzcan E: Antithrombin III prevents 60 min warm intestinal ischemia reperfusion injury in rats. *Res Exp Med (Berl).* 1999; 198(5): 237-46.

167. Buyukgebiz O, Aktan AO, Yegen C, Yalcin AS, Haklar G, Yalin R, Ercan ZS: Captopril increases endothelin serum concentrations and preserves intestinal mucosa after mesenteric ischemia-reperfusion injury. *Res Exp Med (Berl)*. 1994; 194(6): 339-48.
168. Puglisi RN, Strande L, Santos M, Doolin EJ, Hewitt CW, Whalen TV: The effect of cyclosporine in gut ischemic injury: a computerized morphometric and enzymatic analysis. *J Pediatr Surg*. 1996; 31(2): 319-22.
169. Balogh N, Krausz F, Levai P, Ribiczeyne PS, Vajdovich P, Gaal T: Effect of deferoxamine and L-arginine treatment on lipid peroxidation in na intestinal ischaemia-reperfusion model in rats. *Acta Vet Hung*. 2002; 50(3): 343-56.
170. Berlanga J, Prats P, Ramirez D, Gonzalez R, Lopez-Saura P, Aguiar J, Ojeda M, Boyle JJ, Fitzgerald AJ, Playford RJ: Prophylactic use of epidermal growth factor reduces ischemia/reperfusion intestinal damage. *Am J Pathol*. 2002; 161(2): 373-9.
171. Harward TR, coe D, Souba WW, Klingman N, Seeger JM: Glutamine preserves gut glutathione levels during intestinal ischemia/reperfusion. *J Surg Res*. 1994; 56(4): 351-55.
172. Ustundag B, Kazez A, Demirbag M, Canatan H, Halifeoglu I, Ozercan IH: Protective effect of melatonin on antioxidative system in experimental ischemia-reperfusion of rat small intestine. *Cell Physiol Biochem*. 2000; 10(4): 229-36.
173. Dun Y, Hao YB, Wu YX, Zhang Y, Zhao RR: Protective effects of nitroglycerin-induced preconditioning mediated by calcitonin gene-related peptide in rat small intestine. *Eur J Pharmacol*. 2001; 430(2-3): 317-24.
174. Cicalese L, Lee K, Schraut W, Watkins S, Borle A, Stanko R: Pyruvate prevents ischemia-reperfusion mucosal injury of rat small intestine. *Am J Surg*. 1996; 171(1): 97-100.
175. Tetik C, Ozden A, Calli N, Bilgihan A, Bostanci B, Yis O, Bayramoglu H: Cytoprotective effect of trimetazidine on 60 minutes of intestinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Transpl Int*. 1999; 12(2): 108-12.
176. Mocan H, Gedik Y, Erduran E, Mocan ZM, Okten A, Gacar N, Pul N: The role of calcium channel entry blocker in experimental ischemia-reperfusion-induced intestinal injury. *Pol J Pharmacol*. 1995; 47(2): 179-83.
177. Gunel E, Caglayan F, Caglayan O, Dilsiz A, Duman S, Aktan M: Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. *J Pediatr Surg*. 1998; 33(10): 1536-9.

178. Greca FH, Souza Filho ZA, Gonçalves NM, Silva APG, Olandoski M, Mima WH, Mima HH. A influência do azul de metileno na prevenção da lesão pulmonar após isquemia- reperfusão intestinal. *Acta Cir Bras* [serial online]. 2004;19(4):431-40.
179. Mc Cord JM, Fridovich I. The utility of superoxide dismutase in studying free radical reactions. II: The mechanism of the mediation of cytochrome c reduction by a variety of electron carriers. *J Biol Chem*. 1970;245(6):1374-7.
180. Kelner MJ, Bagnell, Alexander NM. Proceedings, Fourth international congress on oxygen radicals wed. 1978;100-1.
181. Mayer B, Brunner F, Schmidt K. Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue. *Biochem Pharmacol*. 1993;45(2):367-74.
182. Gruetter CA, Gruetter DY, Lyon JE, Kadowitz PJ, Ignarro LJ. Relationship between cyclic guanosine 3':5' – monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate., nitroprusside, nitrite and nitric oxide: effects of methylene blue and methemoglobin. *J Exp Ther*. 1981;219(1):181-6.
183. Keaney JF Jr, Puyana JC, Francis S, Loscalzo JF, Stamler JS, Loscalzo J. *Circ Res*. 1994; 74(6):1121-5.
184. Zhang H, Rogiers P, Preiser JC, Spapen H, Manikis P, Metz G, Vincent JL. Effects of methylene blue on oxygen availability and regional blood flow during endotoxic shock.. *Crit Care Med*. 1995;23(10):1711-21.
185. Peter C, Hogwan D, Küpfer A, Lauterburg BH. Pharmacokinetics and organ distribution of intravenous and oral methylene blue. *Eur J Clin Pharmacol*. 2000;56(3):247-50.
186. Weinbroun AA, Goldin I, Kluger Y e Szold A. Methylene blue in preventing hemodynamic and metabolic derangement following superior mesenteric artery clamping/unclamping: an intratracheal vs. intraperitoneal dose-response study. *Shock*. 2002; 17 (5):372-76.
187. Memis D, Karamanlioglu B, Yuksel M, Gemlik I e Pamukcu Z. The influence of methylene blue infusion of cytokine levels during severe sepsis. *Anaesth Intensive Care*. 2002; 30:755-62.
188. Greca FH, Noronha L, Bendhack M, Feres A, Soccol A, Duda JR. Use of small intestine submucosa as ureteral allograft in pigs. *International Braz J Urol*. 2004; 30(4): 327-35.

189. Junqueira LCU, Cossermelli W, Brentani RR. Differential stain of collagen type I, II and III by sirius red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn.* 1979;41:267-74.
190. Bolley SJ, Brandt LJ, Sammartano RJ. History of mesenteric ischemia. *Surg Clin North Am.* 1997;77(2):275-88.
191. Lock G. Acute mesenteric ischemia: classification, evaluation and therapy. *Acta Gastroenterol Belg.* 2002;65(4):220-5.
192. Haglind E, Haglund U, Lundgren O, Romanus M, Shersten T. Grade intestinal vascular obstruction.I. Description of an experimental shock model in the rat. *Circ Shok.* 1980;7(1):83-91.
193. Dalsing MC, Grosfeld JL, Schiffler MA et al. Superoxide dismutase: a celular protective enzyme in bowel ischemia. *J Surg. Res.* 1983;34(6):589-96.
194. Boorstein JM, Ducey Ij, Cronenwett JI. Pharmacologic treatment of occlusive mesenteric ischemia in rats. *J Surg Res.* 1988;44(5):555-60.
195. Kologlu M, Yorganci K, Renda N, Sayek I. Effect of local and remote ischemia- reperfusion injury on healing of colonic anastomoses. *Surgery.* 2000;128(1):99-04.
196. Biondo-Simões MLP, /greca FH, Ioshii SO, Chin EWK, Kimura LY, Lemos MC. Efeitos da isquemia e reperfusão intestinal na cicatrização de anastomoses do intestino delgado- estudo experimental em ratos. *Acta Cir Bras.* 2001;16(supl 2):9-15.
197. Tekin K, Aytakin FO, Ozden A, Bilgihan A, Erdem E, Sungurkin U, Guney Y. Antithrombin III prevents deleterious effects of remote ischemia- reperfusion injury on healing of colonic anastomoses. *Am J Surg.* 2002;184(2):1108-16.
198. Megison SM, Horton JW, Chao H, Walker BS. A new model of intestinal ischemia in the rat. 1990;49(2):168-73.
199. Kuzu MA, Tanik A, Kale IT, Aslar AK, Koksoy C, Terzi C. Effect of ischemia/ reperfusion as a systemic phenomenon on anastomotic healing in the left colon. *World J Surg.* 2000;24(8):990-4.
200. McGovan SE, Murray JJ. Direct effects of neutrophil oxidants on elastase induced extracellular matrix proteolysis. *Am Rev respire dis.* 1987; 135:1986-93.

NORMAS ADOTADAS

Goldenberg S. Orientação normativa para elaboração de tese. Acta Cir Bras 1993; 8(1):1-10.

International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature. Nomina anatomica veterinaria. 3rd ed. New York: Ithaca; 1983.

International Organization for Standardization. Documentation: rules for abbreviation on title words of publication / Documentation: regles pour l'abbreviation des mots dans les titres et des publications. 2nd ed. Paris:ISO; 1984.

International Serial Data system & International Organization for Standardization. Liste d'abbreviations des mots des titres des publications on series: conforme ISO 4-1984 / List of serial title word abbreviation in accordance with ISO 4-1984. Paris:ISDS/ISO, 1985.

International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Ann Inter Med 1997; 126(1):36-47.

Normas para a apresentação de documentos científicos: teses, dissertações, monografias e trabalhos acadêmicos. Curitiba: Editora UFPR, v.2, 2000.

Normas para a apresentação de documentos científicos:redação e editoração. Curitiba: Editora UFPR, v.2, 2000.

Brasil. Lei Federal n.º 6.638 de 08 de maio de 1979: estabelece normas para a prática didático-científica da vivisseccção de animais e determina outras providências. Diário Oficial [República Federativa do Brasil], Brasília, p.1, 10 mai 1979.