

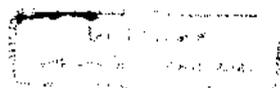
Murillo Antonio Couto

***Avaliação histopatológica no epitélio intestinal
submetido a diferentes tempos de
isquemia e reperfusão programada de 24 horas***

*Tese de doutorado apresentada ao curso de
Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade
Estadual de Campinas para obtenção do
título de doutor em cirurgia.
Área de concentração, cirurgia.*

Orientadora : Prof^ª Dr^ª Ana Terezinha Guillaumon

Campinas, UNICAMP-2000



UNIDADE	30				
N.º CHAMADA:	T/Unicamp				
	C837a				
V.	Ex.				
TOMBO BC/	45586				
PROC.	16-392101				
C	<input type="checkbox"/>	D	<input type="checkbox"/>	X	<input type="checkbox"/>
PREC.	R\$ 11,00				
DATA	01/08/01				
N.º CPD					

CM0015837B-4

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

C837a Couto, Murillo Antonio
Avaliação histopatológica no epitélio intestinal submetido a diferentes tempos de isquemia e reperfusão programada de 24 horas / Murillo Antonio Couto. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

Orientador : Ana Terezinha Guillaumon
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Isquemia – reperfusão. 2. Intestino. I. Ana Terezinha Guillaumon.
II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título

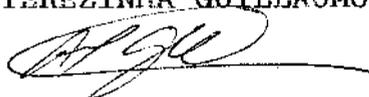
Murillo Antonio Couto

B C

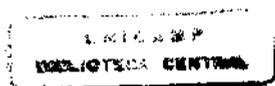
***Avaliação histopatológica no epitélio intestinal
submetido a diferentes tempos de
isquemia e reperfusão programada de 24 horas***

Este exemplar corresponde a versão final da tese de Doutorado apresentada à Comissão de Pós-Graduação em Cirurgia da FCM/UNICAMP, para obtenção do título de Doutor em Cirurgia do médico MURILLO ANTÔNIO COUTO; Campinas, 14 de junho de 2000

Profa.Dra. ANA TEREZINHA GULLAUMON

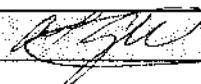


Campinas, 2000



BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

ORIENTADOR: Prof. Dra. Ana Terezinha Guillaumon



MEMBROS:

1. Prof. Dr. Winston Boneti Yoshida: Winston Boneti Yoshida

2. Prof. Dr. Fausto Miranda Júnior: Fausto Miranda Júnior

3. Prof. Dra. Janaína Silva de Luca: Janaína Silva de Luca

4. Prof. Dr. Lúcio Wilson Vieira: Lúcio Wilson Vieira

Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

DATA: 14/06/00

À **Deus**, pela proteção nesta jornada sem o qual eu nada teria conseguido.

Aos meus pais **Antonieta-Albino**, pela dedicação, incentivo, sendo o alicerce de minha formação moral e profissional.

À **Adriana**, minha esposa, mãe dedicada, pelo apoio, incentivo, e por ter entendido esta fase, muitas vezes, de renúncia.

Ao meu filho **Enzo**, motivo de grande alegria nestes momentos e de responsabilidade para com sua formação moral e de homem.

À Prof^a Dr^a **Ana Terezinha Guillaumon**, amiga, verdadeira orientadora, pelo alto espírito científico, pela incansável paciência.

Agradecimentos

À minha irmã Dr^a **Gisele**, pelo apoio, e por ter sido desde jovem um exemplo a ser seguido na vida acadêmica.

Ao meu irmão Prof. Dr. **Wilson**, amigo fiel, grande incentivador, que por muitas vezes me orientou nos caminhos a serem percorridos.

À minha irmã **Patricia**, pelo apoio, e por transmitir tranquilidade nos diversos momentos desta jornada.

À Prof^a Dr^a **Yara Maria Silva de Lucca**, pelo alto espírito científico, pelo tratamento cordial a nós dispensados e pelo trabalho nesta dissertação.

Ao Prof. Dr. **Laurenço Sbragia Neto**, pelo alto espírito científico e ajuda no início desta dissertação.

Ao Prof. Dr. **John Cook Lane**, por ter aberto as portas desta universidade, para minha formação de pós graduado.

Ao Prof. Do Departamento de Cirurgia Vascular da UNICAMP Dr. **George Cardechi Luccas**, pelo apoio e pelo tratamento especial a nós dispensados neste período.

Ao Prof. **Michel Cury**, diretor da Faculdade de Medicina de Catanduva, pelo incentivo e carinho a nós dispensados.

À Sr^a **Eloisa Salgado Fernandes e Srta Kátia Raquel Sigoli**, pelo incentivo, pela dedicação e pelo trabalho de montagem e digitação desta dissertação.

À Prof. **Vera Lúcia Massoni Xavier da Silva**, pela orientação em língua portuguesa.

Ao Sr. **Carlos Fernando Patriani Frasson**, pela dedicação e pelo trabalho de montagem desta dissertação.

Resumo	i
1. Introdução	01
2. Objetivo	03
3. Revisão da Literatura	05
4. Materiais e Métodos	15
5. Resultados	28
6. Discussão	47
7. Conclusão	55
8. Summary	57
9. Referencias Bibliográficas	60
10. Apêndice	68

Lista de Abreviaturas

1. **A.T.P.** - Adenosina
2. **O.D.C.** - O Descarboxilase Ornetina
3. **S.O.D.** - Superóxido Dismutose
4. **C.I.N.C.** - Cytokine Induced neutrophil chemoattractant
5. **G.I** - Grupo I (controle)
6. **G.II** - Grupo II (isquemia 10 minutos)
7. **G.III** - Grupo III (isquemia 20 minutos)
8. **G.IV** - Grupo IV (isquemia 30 minutos)
9. **G.V** - Grupo V (isquemia 40 minutos)
10. **G.VI** - Grupo VI (isquemia 60 minutos)
11. **I.M.** - Índice Mitótico
12. **H.E.** - Hematoxilina Eosina

Tabela 1 - Comprimento do Vilo intestinal

Tabela 2 - Largura do Vilo intestinal

Tabela 3 - Índice mitótico do Vilo intestinal

Tabela 4 - Lâminas com amostra do intestino de ratos do Grupo I - Controle quanto ao comprimento e largura do vilo

Tabela 5 - Lâminas com amostra do intestino de ratos do Grupo II - (10 minutos de isquemia) quanto ao comprimento e largura do vilo

Tabela 6 - Lâminas com amostra do intestino de ratos do Grupo III - (20 minutos de isquemia) quanto ao comprimento e largura do vilo

Tabela 7 - Lâminas com amostra do intestino de ratos do Grupo IV - (30 minutos de isquemia) quanto ao comprimento e largura do vilo

Tabela 8 - Lâminas com amostra do intestino de ratos do Grupo V - (40 minutos de isquemia) quanto ao comprimento e largura do vilo

Tabela 9 - Lâminas com amostra do intestino de ratos do Grupo VI - (60 minutos de isquemia) quanto ao comprimento e largura do vilo

Tabela 10 - Lâminas com amostra do intestino de ratos do Grupo I - (controle) quanto ao número de figuras em mitose em 100 células

Tabela 11 - Lâminas com amostra do intestino de ratos do Grupo II - (10 minutos de isquemia) quanto ao número de figuras em mitose em 100 células

Tabela 12 - Lâminas com amostra do intestino de ratos do Grupo III - (20 minutos de isquemia) quanto ao número de figuras em mitose em 100 células

Tabela 13 - Lâminas com amostra do intestino de ratos do Grupo IV - (30 minutos de isquemia) quanto ao número de figuras em mitose em 100 células

Tabela 14 - Lâminas com amostra do intestino de ratos do Grupo V - (40 minutos de isquemia) quanto ao número de figuras em mitose em 100 células

Tabela 15 - Lâminas com amostra do intestino de ratos do Grupo VI - (60 minutos de isquemia) quanto ao número de figuras em mitose em 100 células

Lista de Figuras

Figura 1 - Animal experimentação com abertura da cavidade abdominal

Figura 2 - Isolamento e clampeamento da artéria mesentérica superior por meio de uma pinça hemostática vascular.

Figura 3 - Isquemia 10 minutos

Figura 4 - Intestino delgado após 40 minutos de isquemia

Figura 5 - Intestino delgado após 60 minutos de isquemia

Figura 6 - (esquerda) - Vilos intestinais de animais do Grupo I

(direita) - Vilos intestinais de animais Grupo III, submetidos a 20 minutos de isquemia.

Figura 7 - Vilos intestinais de animais do Grupo I

Figura 8 - Vilos intestinais de animais do Grupo VI, submetidos a 60 minutos de isquemia.

Figura 9 - Vilos intestinais de animais do Grupo II, submetidos a 10 minutos de isquemia.

Figura 10 - Vilos intestinais de animais do Grupo VI, submetidos a 60 minutos de isquemia.

Figura 11 - Vilos intestinais de animais do Grupo I

Figura 12 - Vilos intestinais de animais do Grupo VI, submetidos a 60 minutos de isquemia.

Figura 13 - Vilos intestinais de animais do Grupo III, submetidos a 20 minutos de isquemia.

Gráfico 1 - Medidas dos comprimentos do vilão intestinal em relação aos grupos

Gráfico 2 - Medidas da largura do vilão intestinal em relação aos grupos

Gráfico 3 - Média do índice mitótico (%) do vilão intestinal em relação aos grupos

RESUMO

A isquemia e a reperfusão podem acarretar diversas alterações histopatológicas, bioquímicas e inflamatórias no intestino. No presente estudo objetivamos observar as alterações que ocorrem no epitélio intestinal de ratos, quando submetidos à isquemia de tempos variados e reperfusão programada de 24 horas. O experimento, realizado no intestino de ratos submetidos a diferentes tempos de isquemia, é assim discriminado ; Grupo I - controle, Grupo II- isquemia 10 minutos, Grupo III - isquemia 20 minutos, Grupo IV- isquemia de 30 minutos, Grupo V- isquemia 40 minutos e Grupo VI- isquemia 60 minutos. Todos os grupos foram submetidos ao mesmo tempo de reperfusão (24 horas),e realizando-se ressecção do intestino para análise histopatológica. Para avaliação das possíveis diferenças entre os grupos previamente definidos para os variáveis comprimento do vilo, largura do vilo e índice mitótico, usamos o teste não paramétrico para médias de KRUSKAL-WALLIS, ressaltando-se que, quando houve significância estatística, completamos este teste pelo teste de comparações múltiplas. O estudo demonstrou que, do ponto de vista qualitativo o epitélio intestinal se encontra regenerado, ao ser submetido a diferentes tempos de isquemia e reperfusão de

24 horas. Entretanto, observamos que, ao se analisar a morfometria (análises quantitativas), considerando como parâmetro o comprimento e a largura do viló bem como o índice mitótico, detectamos alterações significativas. Estas alterações caracterizam-se por uma diminuição do comprimento e aumento da largura do viló à medida que o tempo de isquemia aumentava. Acrescenta-se também que o índice mitótico apresentou aumento, após ter se iniciado a isquemia (sendo significativo grupo III em relação ao controle).

1- INTRODUÇÃO

As alterações que ocorrem no epitélio intestinal devido ao processo de isquemia e reperfusão vêm sendo objeto de inúmeros estudos. Dentre esses estudos, as alterações histopatológicas ocorridas no epitélio intestinal, após períodos de isquemia e reperfusão, foram descritas por diversos autores. Ressalte-se, porém, que a maior parte desses estudos objetivou avaliar as alterações e suas conseqüências com isquemias programadas e reperfusão, em curtos períodos de tempo e sempre menos que 24 horas.

Outros estudos demonstraram a importância do conhecimento de processos bioquímicos para melhor entendimento das reações desencadeadas, após um período de isquemia e posterior reperfusão. Esses estudos possibilitaram, mais recentemente, a utilização de fármacos que poderiam atuar, minimizando as conseqüências danosas desencadeadas, sistemicamente, no local (intestino), pela isquemia e reperfusão.

Dessa maneira, em nosso trabalho, abordaremos as possíveis alterações histopatológicas ocorridas, como também, se o epitélio intestinal se encontra reconstituído, após o processo de isquemia e reperfusão programados, porém com um tempo de reperfusão prolongado (24 horas).

2- OBJETIVO

O presente trabalho tem por objetivo estudar as alterações histológicas qualitativas e quantitativas (morfométricas), na parede intestinal de ratos, após isquemia com tempos variados e reperfusão de 24 horas.

3- REVISÃO DE LITERATURA

O estudo de diversos autores sobre o mecanismo da lesão isquêmica e as alterações histológicas acarretadas pelo processo de isquemia e reperfusão, no intestino, comprovaram que as lesões causadas pela diminuição do fluxo ocorriam no sentido do vilô para a cripta, constatando-se que havia maior sensibilidade do vilô ao processo isquêmico. **CHIU, et al. (1970); HAGLUNG & LUNDGREN, (1972); BATELLI, DELLA CORTE, STIRPE, (1972); SBRAGIA NETO, (1996).** A partir daí, outros estudos foram realizados na tentativa de observar e explicar as razões deste acometimento. Assim, foi observado também que a proliferação celular, ocorrida após destruição causada pela isquemia, acontece no sentido cripta para o vilô, estando o tempo do ciclo celular diminuído nos vilos, retardando a sua regeneração após isquemia. **RIJKE et al., (1976); RIJKE, R.P.C & GART, R., (1979).**

Em 1978, **LUNDGREN & HAGLUNG** observaram que a alteração do fluxo sanguíneo poderia favorecer a oxigenação na base do vilô e prejudicar a do topo.

As alterações histopatológicas ocorridas, após se realizar isquemia intestinal, eram proporcionais ao tempo de exposição dos tecidos intestinais à isquemia, conforme **GRANGER et al,(1981); BOUNUS,(1982); ILLY & HAMAR, (1992); UDASSIN, VROMEN, HASKELE,(1994); SBRAGIA NETO (1996). ILLY & HAMAR, (1992)**. Esses autores observaram ainda que após ter ocorrida a lesão intestinal e estando o intestino reperfundido, poderia ocorrer intensa regeneração do epitélio, em um período próximo a três horas de reperfusão.

Outros estudos, como os efetuados por **GRISHAM, HERNANDEZ, GRANGER, (1986); KUBES et al., (1990)**, demonstraram evidência de alterações bioquímicas e a presença de uma resposta inflamatória do epitélio intestinal em relação ao processo de isquemia e reperfusão. Os autores citados constataram também que, durante a isquemia, ocorria uma significativa aderência e extravazamento de leucócitos.

Em 1988, **ZAMBETIS & GROSSMAN** observaram uma alteração, na resposta plaquetária, acarretada pela isquemia. Para esse fato, os autores sugerem que uma resposta alterada do endotélio aos derivados vasoativos das plaquetas podem contribuir para o vasoespasmo encontrado, durante o período de reperfusão.

KUBES et al. (1990), ressaltando a importância da resposta plaquetária sugerem que o “fator ativador das plaquetas” apresenta um importante papel na interação entre os leucócitos circulantes e as alterações micro vasculares do endotélio causadas pela isquemia e a reperfusão.

Dessa forma, as alterações bioquímicas passaram a ser investigadas em intestinos submetidos à isquemia e reperfusão.

ZAMBETIS & GROSSMAN, (1988) evidenciaram uma ausência de resposta à Acetilcolina e ao ADH. Em 1991, **SIEMS et al.**, realizaram isquemia intestinal em ratos por 30 minutos e reperfusão por 10 minutos e encontraram diminuição na concentração de ATP e GTP. Entretanto, em animais tratados com Superóxido-Dismutase, tais autores verificaram uma acentuada restauração do nível de nucleotídeos durante a reperfusão.

Em 1991, **FUJIMOTO et al. (1991)** observaram que a Descarboxilase-ornitina (ODC) está envolvida na reparação da mucosa intestinal, após processo de isquemia e reperfusão. Dessa forma, após realizarem oclusão da artéria mesentérica inferior, dosaram a (ODC) e constataram que ela apresenta aumento da atividade seis horas após isquemia e reperfusão, fazendo-se necessário mais de 72 horas para que a atividade enzimática retorne ao normal. O uso de inibidor da atividade da (ODC), o Alpha-difluormetil ornitina, abole,

completamente, o aumento dessa atividade durante a isquemia e reperfusão. Estes autores estudaram a absorção dos lipídeos no intestino e verificaram que o grupo com o inibidor da (ODC) não restabelecia este transporte em 48 horas. Os referidos autores concluíram que a (ODC) apresenta um importante papel na restauração da função da mucosa, após processo de isquemia e reperfusão.

Diante desse fato verificado ainda, alguns autores estudaram a importância e a influência dos radicais livres do oxigênio nas lesões ocorridas, devido ao processo de isquemia e reperfusão.

Assim, em 1982, **PARKS et al.** observaram que o topo do vilão da mucosa intestinal apresentava maior sensibilidade à ação dos radicais livres do que ao fenômeno hipóxico propriamente dito. **HORTON & WALKER (1993)** notaram que os radicais livres do oxigênio produzidos, durante o período de isquemia, e a fase de reperfusão contribuem para a oxidação lipídica das células da membrana e previnem um aumento da permeabilidade da mucosa, podendo potencializar a translocação bacteriana e sepsis.

Outros estudiosos passaram a avaliar a importância dos radicais livres, derivados da oxidação de lipídios e a possibilidade de, por meio da inibição destes radicais, se diminuir o dano causado ao intestino.

VAN YE et al.(1993) constataram ainda que o edema, a descamação e a hemorragia da lâmina própria podem ser encontrados nos intestinos submetidos à isquemia e reperfusão, tratados ou não com o inibidor da peroxidação de lipídios.

A gravidade das lesões ocorridas, durante o período da isquemia e reperfusão, fez com que diversos estudiosos procurassem auxílio terapêutico com o objetivo de minimizar ou ainda tentar abolir os efeitos deletérios que poderiam ser causados por esse processo.

BOORSTEIN, DACEY, CRONENWETT (1988) estudaram a utilização de fármacos na isquemia mesentérica após oclusão artéria mesentérica de ratos por 85 minutos. Os estudiosos observaram que a utilização de Angiotensina II, radicais livres e vasopressina não aumentaram, significativamente, a taxa de mortalidade, nas 48 horas após a cirurgia, em relação ao grupo controle (solução salina). Concluíram que a administração de quelantes de radicais livres pode prevenir lesões provocadas por estes, durante a isquemia e ainda prolongar o tempo de tolerância do intestino à isquemia e reperfusão.

BILBAO et al (1991) utilizaram-se de drogas antioxidantes, para diminuir os efeitos da isquemia e reperfusão. Dessa forma, realizaram

clameamento da artéria mesentérica superior de ratos por 120 minutos e administraram Allopurinol (GII) e a Superóxido-Dismutase (GIV) via femoral, nos últimos 20 minutos da isquemia. Observaram que ambas as drogas diminuía a mortalidade, quando comparada ao grupo controle (sem droga), e que o Allopurinol foi menos efetivo que a Superóxido-Dismutase, ao se avaliar as alterações histológicas presentes.

LEHMANN et al. (1995) estudaram a influência da administração de quelantes de radicais livres do oxigênio, no intestino submetido à isquemia e reperfusão. Para esse estudo, realizaram a administração de Ascorbato, Tocoferol e Oxipurinol em 20 ratos, após clameamento de artéria mesentérica superior por 1 hora. Administram ainda as mesmas drogas em 10 pacientes com isquemia intestinal aguda. Esses autores observaram que, nos animais que receberam os quelantes dos radicais, as alterações histológicas e bioquímicas da isquemia e reperfusão foram menores em relação ao grupo controle. Os pacientes que receberam as drogas apresentaram uma mortalidade global de 10%.

A conclusão a que chegaram é a de que a administração de quelantes de radicais livres pode prevenir lesões provocadas por esses elementos durante a

isquemia e ainda prolongar o tempo de tolerância do intestino à isquemia e reperfusão.

SCHLEIFFER & RAUL (1996) estudaram a possibilidade de se administrar drogas (L-Arginina e Molsidomine) e assim alterar os efeitos de isquemia e reperfusão na mucosa intestinal. Ressalte-se que a L-Arginina, é um substrato para a síntese do óxido nítrico e a Molsi Domina um doador óxido nítrico, foram administrados, previamente, a ratos submetidos à isquemia mesentérica por 90 minutos. Após 24 horas, determinaram a permeabilidade de barreira mucosa e nível do GMP cíclico na mucosa. Os dados observados revelaram um índice de sobrevivida maior nos animais que receberam as drogas em relação ao grupo controle, pois a permeabilidade da barreira estava diminuída nos animais receptores de L-arginina. Concluíram, portanto, que a administração das drogas (L-arginina e Molsidonina) pode melhorar a sobrevivida e a função da barreira mucosa, após processo isquemia e reperfusão intestinal.

DESHMUKH et al. (1997) observaram, após 45 minutos de isquemia e quatro horas de reperfusão, que a atividade da superóxido dismutase (SOD) poderia proteger os tecidos da infiltração leucocitária, bem como da

peroxidação lipídica ocorridas durante a isquemia e a fase de reperfusão intestinal.

NAKAMURA et al. (1997) estudaram a influência do ácido ascórbico na prevenção dos efeitos deletérios da isquemia e reperfusão ao intestino de ratos. Para isso, administraram ácido ascórbico intraperitoneal em ratos. As amostras do intestino foram ressecadas, antes e depois da isquemia e após 20 minutos de reperfusão. Os autores observaram que o ácido ascórbico pode agir como antioxidante, atuando contra a lesão causada pela peroxidação dos tecidos, possivelmente, "quelando" radicais livres do oxigênio e reduzindo a reação de peroxidação.

LEFER et al. (1997) estudaram a possibilidade do Peroxinitrito inibir a resposta leucocitária celular, durante o processo de isquemia e reperfusão em ratos. Nesse estudo, observaram fortes evidências de que o Peroxinitrito, ânion formado pela interação do superóxido com o óxido nítrico, pode inibir a resposta celular leucocitária, bem como exercer proteção celular aos efeitos lesivos do processo de isquemia e reperfusão ao coração.

YAGIHASHI et al.(1998) estudaram a ação da "Cytokine induced neutrophil chemoattractant" (CINC). Segundo relatos dos autores, a ação da CINC é baseada na atividade quimiotóxica específica dos neutrófilos.

Acrescentam os autores citados que, durante o período de isquemia e reperfusão a CINC se mantém elevada no plasma e que ocorre uma relação entre o grau de lesão da mucosa intestinal e a elevação da CINC. Dando seqüência aos estudos, os autores pesquisaram ainda o fato de se com a administração de anticorpos anti CINC reduzir-se-ia o grau da lesão causado pela isquemia e reperfusão no intestino. Concluíram que a CINC apresenta um importante papel nas lesões ocorridas, durante o período de isquemia e reperfusão e que, bloqueando-se a atividade da CINC, pode-se obter benefícios na prevenção das lesões acarretadas pela isquemia e reperfusão.

4- MATERIAL E MÉTODO

O material e o método utilizado em nosso estudo, serão descritos e apresentados a seguir:

4.1. Animal de Experimentação

Foram utilizados, neste experimento, um grupo de 30 ratos da raça Wistar, divididos em seis grupos de cinco animais do sexo masculino, com idade média de 39,7 dias com peso médio de 244 gramas. A seleção dos animais foi cuidadosa, excluindo-se aqueles que apresentavam descamação da pele, olho lacrimejante, perda de pêlos e alteração no comportamento.

4.2. Planejamento

Os animais foram divididos em seis grupos de cinco animais, assim discriminados:

- Grupo I - Controle
- Grupo II - Grupo isquemia 10 minutos
- Grupo III - Grupo isquemia 20 minutos
- Grupo IV - Grupo isquemia 30 minutos
- Grupo V - Grupo isquemia 40 minutos
- Grupo VI - Grupo isquemia 60 minutos

Todos os animais foram submetidos à operação que consistiu em uma isquemia intestinal por meio da colocação de pinças vasculares hemostáticas, na artéria mesentérica superior, de acordo com os tempos previamente determinados para cada grupo. Em seguida a este procedimento, realizou-se a reperfusão do intestino, após retirada das pinças e liberado o fluxo da artéria mesentérica. Passado um período de 24 horas, os animais foram reoperados e realizado biópsia intestinal para anátomo-patológico. Os animais foram sacrificados, após a segunda intervenção cirúrgica.

4.3. Anestesia

O anestésico utilizado foi o Thiopental, na dose de 30 mg/kg/peso corporal, intravenoso caudal, ressaltando-se que empregou-se o mesmo anestésico em todos os grupos, não sendo necessário realizar suplementação anestésica.

4.4. Pré operatório

O preparo pré operatório foi realizado no Biotério de Microprocedimentos e Pesquisa Vascular do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da F.C.M. -UNICAMP.

Os animais estavam aclimatizados e recebiam dieta de água e ração balanceada “ad libitum”.

O preparo cirúrgico incluiu rapagem dos pêlos e antissepsia com álcool iodado 2%, após o procedimento anestésico e fixados em prancha aquecida a 37^oC.

4.5. Intra operatório dos grupos

No intra operatório, foi realizada isquemia mesentérica com tempos previamente determinados para os diferentes grupos. No Grupo I, considerado grupo de controle, realizamos somente a abertura da cavidade abdominal por planos com exposição das alças e fechamento por planos. No grupo II, o mesmo procedimento operatório do grupo I, porém fizemos a dissecação e colocação de pinças hemostáticas na artéria mesentérica superior por um tempo de 10 minutos. Após este tempo, efetuamos o desclameamento da artéria mesentérica superior com posterior fechamento por planos.

Nos grupos III, IV, V e VI seguiu-se a mesma técnica dos anteriores, com tempo de clampeamento da artéria mesentérica superior de 20, 30, 40, 60 minutos respectivamente.

4.6. Técnica operatória

O procedimento operatório efetuou-se através de laparotomia mediana com abertura dos planos da parede, peritônio anterior e posterior.

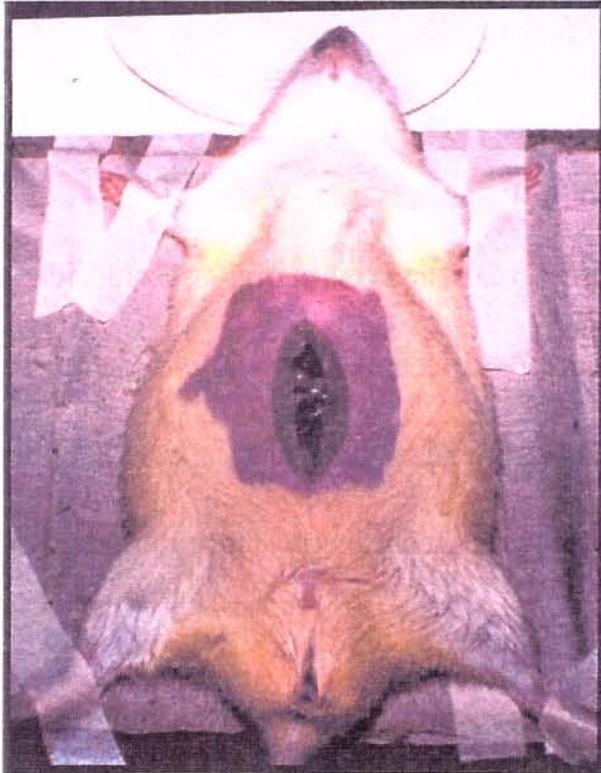


Figura 1 – Animal experimentação com abertura da cavidade abdominal

Realizamos a exposição das alças com exteriorização destas de cavidade abdominal. Uma vez reconhecida a artéria mesentérica superior foi realizada a dissecação da mesma. Colocamos pinça hemostática vasculares para o clampeamento da artéria mesentérica superior de acordo com o tempo de isquemia previamente determinado para cada grupo respectivamente.

Grupo I - Controle

Grupo II - Isquemia 10 minutos

Grupo III - Isquemia 20 minutos

Grupo IV - Isquemia 30 minutos

Grupo V - Isquemia 40 minutos

Grupo VI - Isquemia 60 minutos

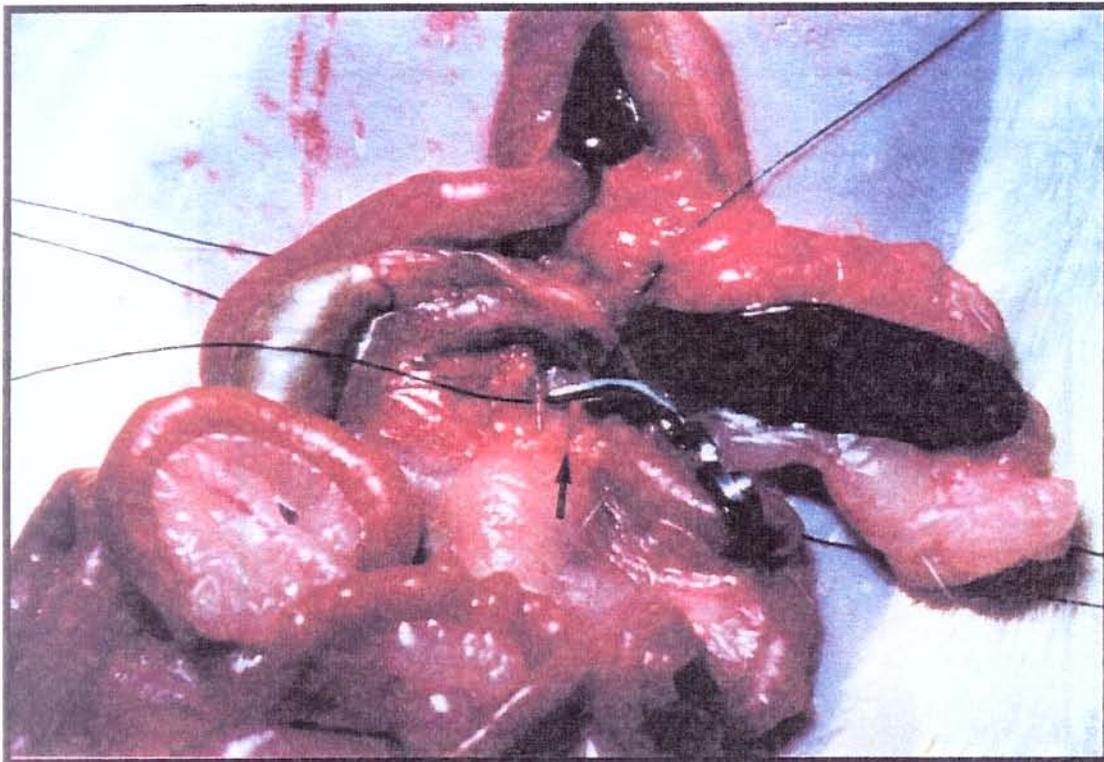


Figura 2 – Isolamento e clampeamento da artéria mesentérica superior por meio de uma pinça hemostática vascular (seta).

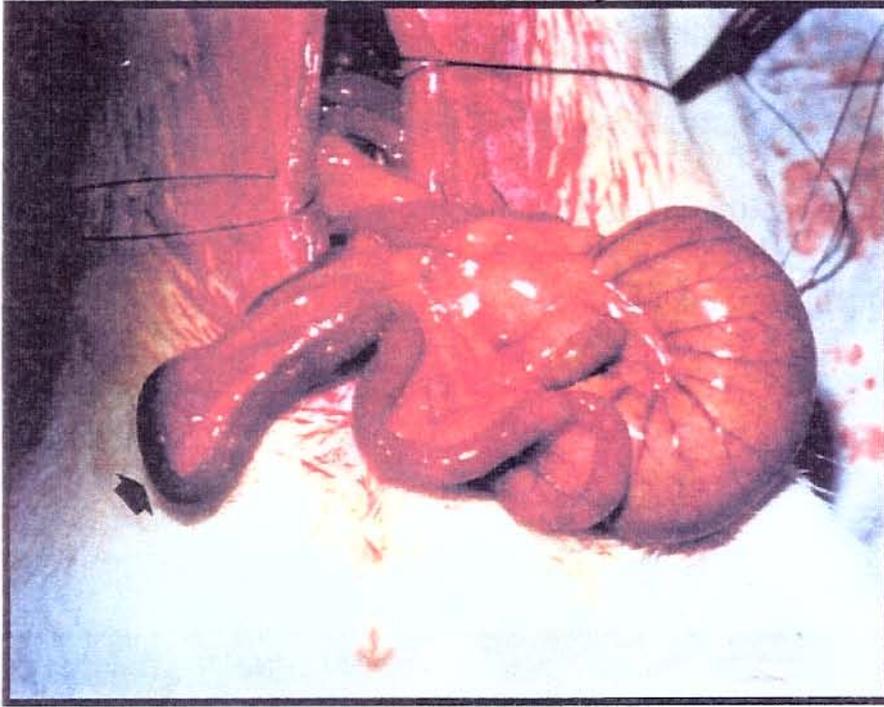


Figura 3 – Isquemia 10 minutos – coloração vermelho-vinho da parte proximal do intestino delgado (seta).

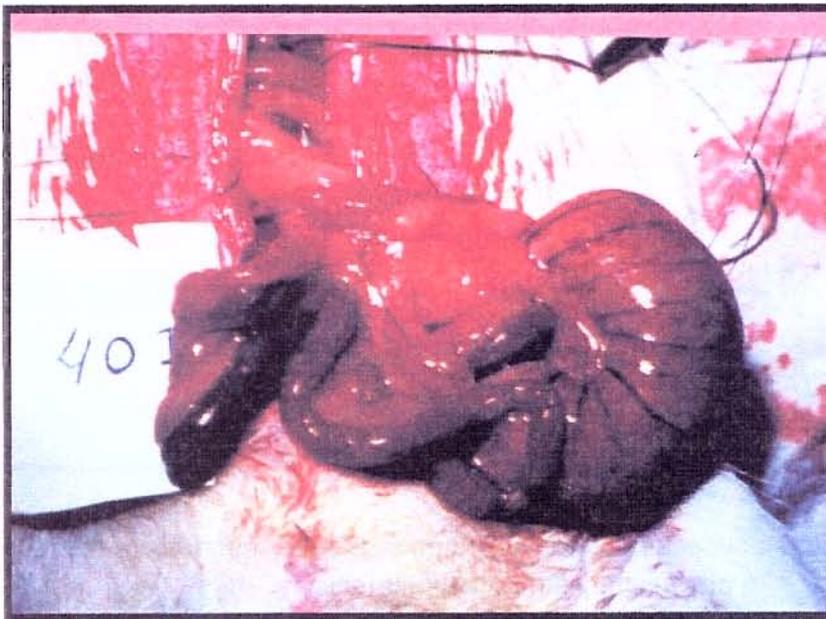


Figura 4 – Intestino delgado após 40 minutos de isquemia.

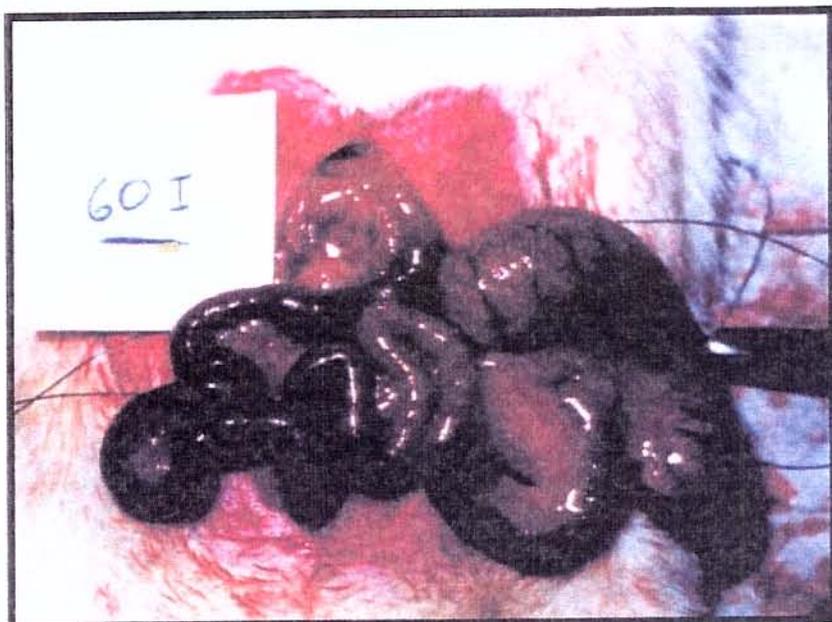


Figura 5 – Intestino delgado após 60 minutos de isquemia.

Após o clampeamento determinado, realizamos a retirada das pinças vasculares hemostáticas da artéria mesentérica superior com recolocação das alças intestinais na cavidade abdominal e fechamento por planos do peritônio, aponeurose e pele.

4.7. Pós operatório

Os animais foram mantidos em gaiolas individuais com dieta líquida e sólida “ad libitum”. Após 24 horas do término da primeira cirurgia, eles foram anestesiados com éter via inalatório e reoperados pela mesma equipe, adotando-se a mesma técnica, com o objetivo de realizar a coleta do material necessário para a avaliação.

4.8. Coleta do material

Após laparotomia mediana, realizou-se a identificação da válvula íleo cecal e posterior ressecção intestinal. A coleta de todos os fragmentos de intestino obedece sempre a disposição anatômica da irrigação das arcadas vasculares e o sentido caudal para cranial e do íleo para o jejuno. O material foi conservado em formol.

4.8.1. Sacrifício dos animais

Após as coletas e biopsias, os animais foram sacrificados com dose letal de éter, conforme o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, dentro das normas éticas.

4.8.2. Procedimentos gerais em microscopia óptica

Os fragmentos de intestino foram lavados em solução salina 0,9%, abertos pela sua borda anti-mesentérica, estendidos sobre pequenas placas de cortiça com a mucosa exposta e suas quatro bordas presas por alfinetes. Após esses procedimentos, os fragmentos foram colocados em solução de Carnoy por seis horas. Depois da fixação, processaram-se os fragmentos de acordo com os métodos rotineiros para microscopia óptica. Os cortes histológicos de cinco micrômetros de espessura foram submetidos à coloração pelo hemalúmen e, depois, pela eosina.

A montagem dos cortes em cada lâmina foi feita do seguinte modo: escolheu-se o primeiro corte da fila de parafina, em seguida, desprezaram-se os cinco cortes subsequentes e montou-se o sétimo. Este procedimento foi sucessivo, até a obtenção de cinco cortes por lâmina.

O objetivo dessa montagem foi a detecção de achados microscópicos distintos entre si, para as avaliações morfométricas

4.8.3. Avaliação histológica qualitativa

Lesões da mucosa intestinal, no período isquêmico e na fase de restauração do fluxo sanguíneo (lesão de reperfusão), foram avaliadas, mediante a análise dos cortes histológicos, nos diferentes tempos de isquemia e reperfusão de todos os animais pertencentes aos seis grupos. A inflamação e a necrose dos vilos e criptas intestinais foram graduadas, de acordo com a classificação proposta por **GRANGER, D.N.; HOLLWARTH, M.E.; PARKS, D.A. (1986)** descrita a seguir :

a - Vilos

- 0- sem lesão
- 1- lesão na ponta de raros vilos
- 2- lesão na extremidade da maioria dos vilos

3- lesão na extremidade da maioria dos vilos e da porção média de medição de 10 vilos

4- lesão da extremidade das porções média e baixa da maioria dos vilos

b - Criptas

0- sem lesão

1- lesão de raras criptas (<10%)

2- lesão de criptas esparsas (>10% e <50%)

3- lesão de muitas criptas (>50% e <75%)

4- lesão da maioria das criptas (75%)

4.8.4. Avaliação histológica quantitativa

Com o auxílio de uma ocular 8x e com uma escala graduada e objetiva de 10x, foi efetuada a medição de 10 vilos bem orientados (cortados em toda sua longitude) em cada um dos animais, nos diferentes tempos de isquemia.

Após a medição dessas estruturas, procedeu-se a calibração da escala da ocular com uma lâmina especial e provida de divisões de 0,01mm (10um), visando a transformar as medidas (obtidas em unidades da ocular) em micrômetros de modo a expressar, adequadamente, as dimensões das estruturas mencionadas em unidades do sistema métrico.

O índice Mitótico (IM) corresponde à porcentagem dos núcleos em mitose de uma dada população celular em relação àqueles em interfase.

Este foi obtido, contando-se 100 células das regiões média e ou do fundo das glândulas intestinais (criptas intestinais) e anotando-se, dessas 100 células, quantos núcleos estavam em mitose. Para cada um dos animais dos diferentes grupos foram contadas 500 células de 5 campos microscópicos, tomados ao acaso.

4.9. Método Estatístico

Para avaliarmos possíveis diferenças entre os grupos previamente definidos para os variáveis comprimento do vilo, largura do vilo e índice mitótico, usamos o teste não paramétrico para médias de **KRUSKAL-WALLIS**. Ressalte-se que, quando houve significância estatística, complementamos este teste, adotando-se o teste de comparações múltiplas.

O nível de significância para a rejeição da hipótese de nulidade foi fixado, sempre em um valor menor ou igual do que 0,05 (5%).

Quando a estatística calculada apresentou significância, usamos um asterisco (*) para caracterizá-la.

As médias foram calculadas e apresentadas apenas a título de informação.

Com a utilização do teste estatístico não paramétrico, lançamos o pressuposto de que as variáveis em estudo não se comportam como curva de GAUSS . Em sendo assim, faz sentido o cálculo dos desvios-padrão. (Siegel S, 1.975; Hollander M, Wolfe DA; 1.973)

5- RESULTADOS

Após efetuarmos todos os procedimentos descritos no item 4, passamos, nesta etapa, à apresentação dos resultados obtidos, conforme descrição abaixo.

5.1. Avaliação histológica qualitativa

Ao avaliarmos qualitativamente as amostras intestinais pertencentes aos animais dos diferentes grupos, constatamos uma completa regeneração da mucosa intestinal, após período de reperfusão de 24 horas.

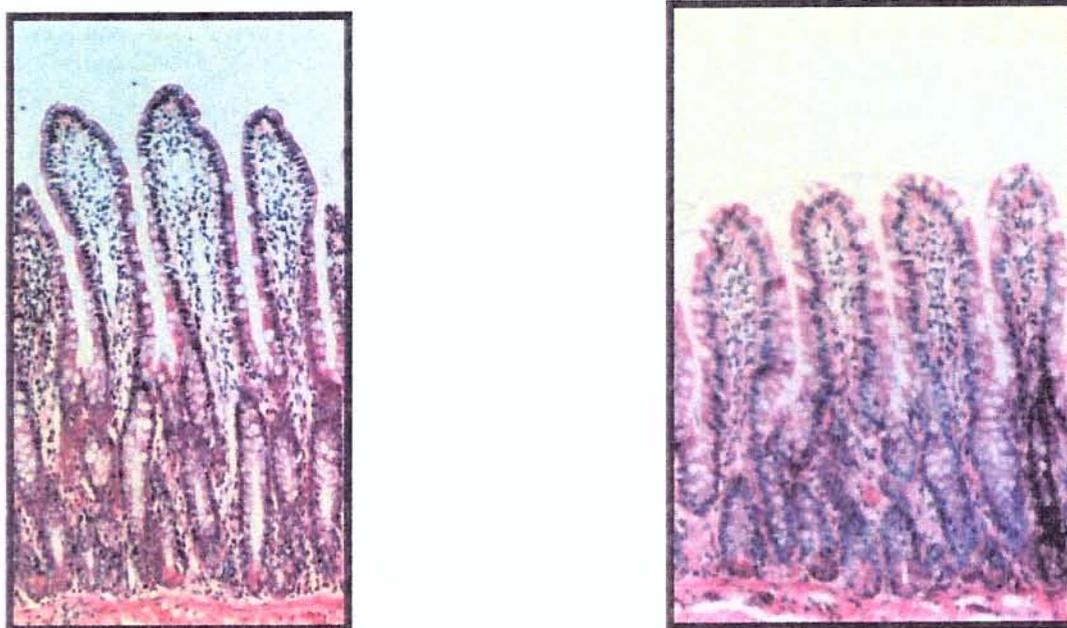


Figura 6 – A esquerda – Vilos intestinais de animais do Grupo I (controle), com coloração Hematoxilínio eosina (H.E.). Aumento 100x.

A direita – Vilos intestinais de animais do grupo III, submetidos a 20 minutos de isquemia. Coloração H.E. . Aumento 100x.

5.2. Avaliação histológica quantitativa (morfométrica)

Ao realizarmos a avaliação morfométrica dos vilos intestinais dos diferentes grupos, observamos uma redução no seu comprimento, à medida que aumentava o tempo de isquemia. Esta redução do comprimento do vilão foi estatisticamente significativa, quando comparamos os vilos submetidos à isquemia de 60 minutos (grupo VI) em relação ao grupo controle (ausência isquemia) e aos vilos submetidos à isquemia de 10 minutos (grupo II).

Tabela 1. Comprimento do Vilo intestinal (μm) de animais submetidos a aumento progressivos do tempo de isquemia segundo os grupos I (controle), grupo II (10 minutos), grupo III (20 minutos), grupo IV (30 minutos), grupo V (40 minutos) e grupo VI (60 minutos).

Grupo	I	II	III	IV	V	VI
Comprimento do Vilo Intestinal	287	275	249	193	211	166
	275	277	216	196	219	172
	286	251	176	181	190	170
	274	243	203	187	166	174
	281	261	245			169
Média	280,60	261,40	217,80	189,30	196,50	170,20

Teste de Kruskal-Wallis

$$H_{\text{crit}} = 11,07$$

$$H_{\text{calc}} = 22,54$$

$$H_{\text{corr}} = 22,55$$

H_{crit} - crítico

H_{calc} - calculado (calculado \geq crítico estatisticamente significante)

H_{corr} - corrigido

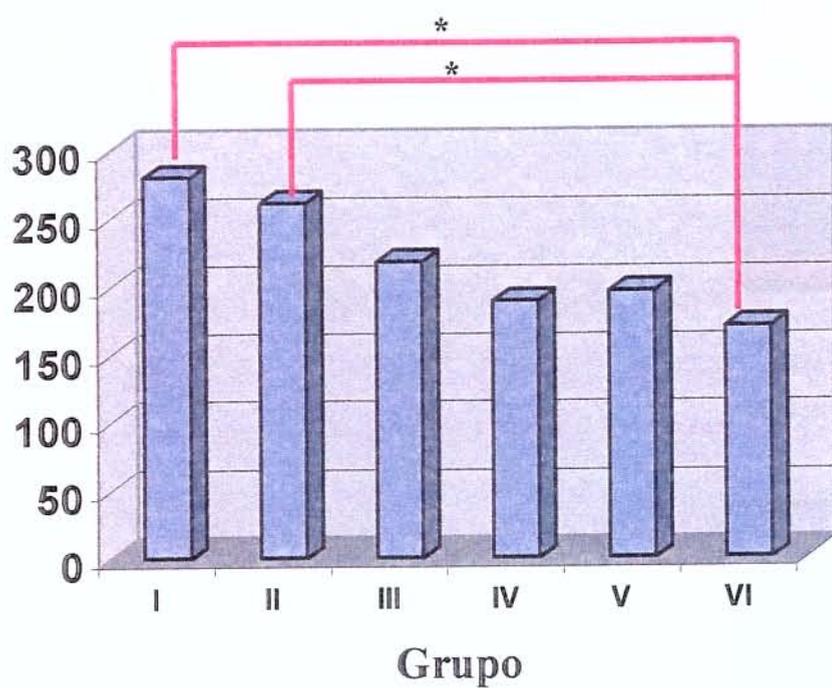
Teste de comparações múltiplas

PARES	VADMP	DMS
I, II	4,00	15,27
I, III	10,90	15,27
I, IV	15,30	16,20
I, V	14,93	16,20
I, VI	21,40*	15,27
II, III	6,90	15,27
II, IV	11,30	16,20
II, V	10,93	16,20
II, VI	17,40*	15,27
III, IV	4,40	16,20
III, V	4,03	16,20
III, VI	10,50	15,27
IV, V	0,38	17,07
IV, VI	6,10	16,20
V, VI	6,48	16,20

VADMP - diferença calculada entre mediano dos postos

DMS - diferença mínima significativa

Gráfico 1. Médias dos comprimentos do vilo intestinal (μm) em relação aos grupos.



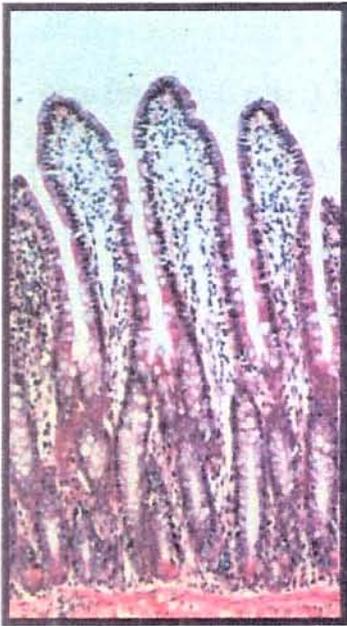


Figura 7 – Vilos intestinais de animais do Grupo I (controle), com coloração Hematoxilina eosina (H.E.). Aumento 100x.



Figura 8 - Vilos intestinais de animais do grupo VI, submetidos a 60 minutos de isquemia. Coloração H.E. . Aumento 100x.



Figura 9 - Vilos intestinais de animais do grupo II, submetidos a 10 minutos de isquemia. Coloração H.E. . Aumento 100x.

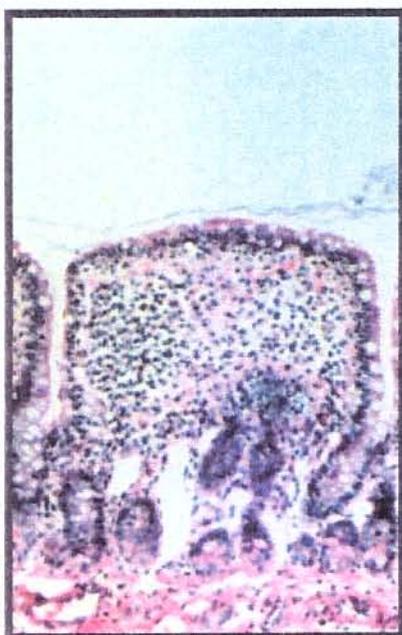


Figura 10 - Vilos intestinais de animais do grupo VI, submetidos a 60 minutos de isquemia. Coloração H.E. . Aumento 100x.

Os resultados ainda sugerem, ao se comparar o grupo IV (isquemia 30 minutos) e o grupo V (isquemia 40 minutos) com relação ao grupo controle, que o valor da estatística calculada está próxima do valor crítico, (15,3 para 16,2) e (14,93 para 16,2) respectivamente.

Ao analisarmos a largura do vilo intestinal observamos um alargamento da sua área. Ressalte-se que tal alargamento é significativo, quando comparamos o grupo VI (isquemia 60 minutos) com relação ao grupo controle (ausência isquemia).

Tabela 2. Largura do Vilo intestinal (μm) de animais submetidos a aumento progressivos do tempo de isquemia segundo os grupos I (controle), grupo II (10 minutos), grupo III (20 minutos), grupo IV (30 minutos), grupo V (40 minutos) e grupo VI (60 minutos).

Grupo	I	II	III	IV	V	VI
Largura Do Vilo Intestinal	77,00	99,00	89,00	89,00	75,00	90,00
	76,00	78,00	87,00	88,00	77,00	91,00
	75,00	83,00	90,00	87,00	93,00	89,00
	73,00	78,00	78,00	82,00	93,00	91,00
	75,00	80,00	80,00			90,00
Média	75,00	83,60	84,80	86,50	84,50	90,00

Teste de Kruskal-Wallis

$$H_{\text{crit}} = 11,07$$

$$H_{\text{calc}} = 13,52$$

$$H_{\text{corr}} = 13,60$$

H_{crit} - crítico

H_{calc} - calculado

H_{corr} - corrigido

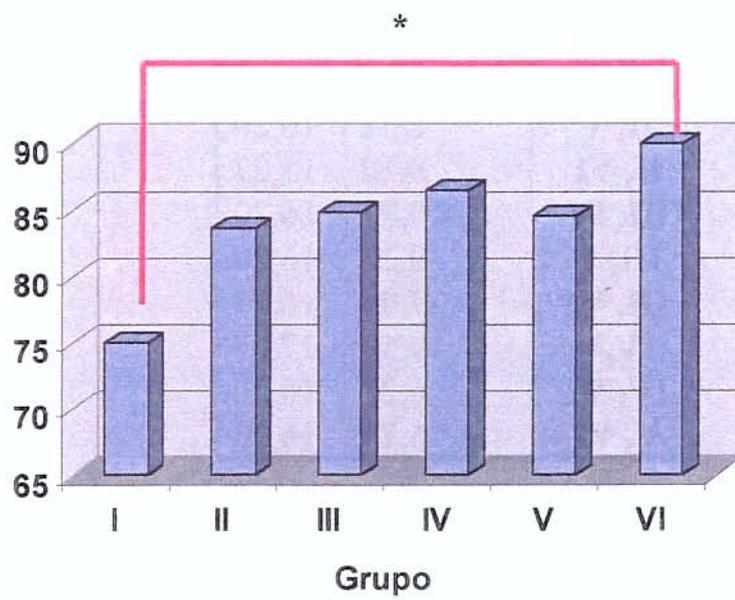
Teste de comparações múltiplas

PARES	VADMP	DMS
I, II	10,60	15,27
I, III	11,70	15,27
I, IV	12,43	16,20
I, V	11,93	16,20
I, VI	18,70*	15,27
II, III	1,10	15,27
II, IV	1,82	16,20
II, V	1,32	16,20
II, VI	8,10	15,27
III, IV	0,72	16,20
III, V	0,22	16,20
III, VI	7,00	15,27
IV, V	0,50	17,07
IV, VI	6,27	16,20
V, VI	6,77	16,20

VADMP - diferença calculada entre mediano dos postos

DMS - diferença mínima significante

Gráfico 2. Médias da largura (μm) do vilo intestinal em relação aos grupos



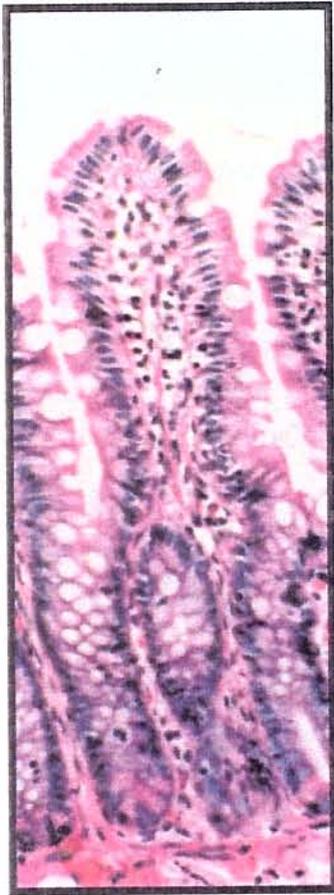


Figura 11 - Vilos intestinais de animais do grupo I (controle) ausência de isquemia. Coloração H.E. . Aumento 256x.

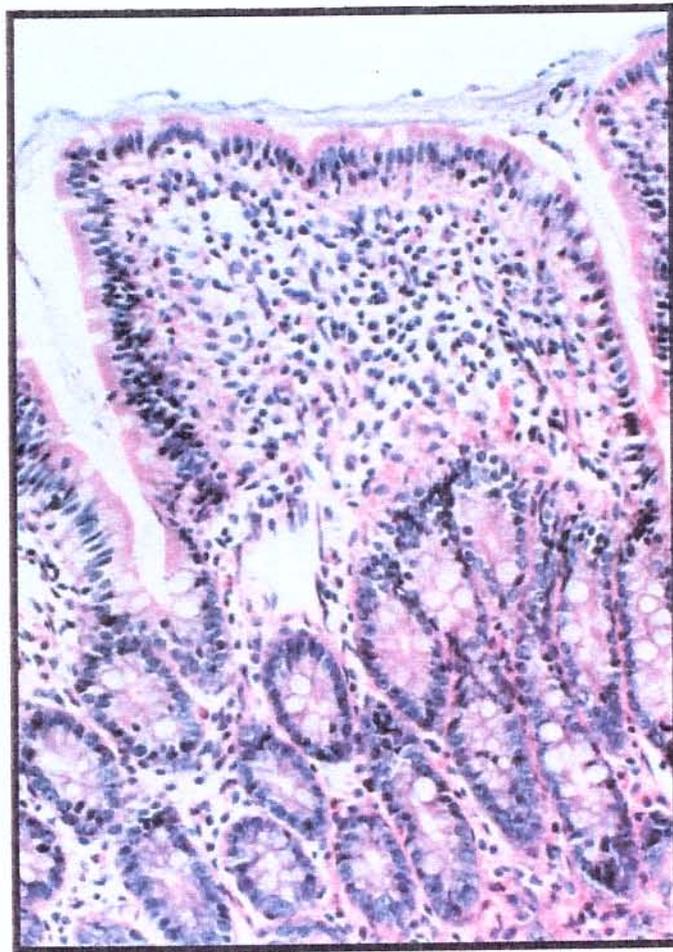


Figura 12 - Vilos intestinais de animais do grupo VI, submetidos a 60 minutos de isquemia. Coloração H.E. . Aumento 256x.

Ao observarmos o índice mitótico dos vilos dos diferentes grupos, encontramos um aumento da porcentagem dos núcleos em mitose, nos grupos que sofreram isquemia em relação ao grupo controle.

Entretanto, na análise estatística encontramos diferença significativa, ao compararmos o grupo III (isquemia 20 minutos) com o grupo controle.

Tabela 3. Índice mitótico do Vilo intestinal (%) de animais submetidos a aumento progressivos do tempo de isquemia segundo os grupos I (controle), grupo II (10 minutos), grupo III (20 minutos), grupo IV (30 minutos), grupo V (40 minutos) e grupo VI (60 minutos).

Grupo	I	II	III	IV	V	VI
Índice Mitótico do Vilo Intestinal	4,00	9,00	10,00	9,00	9,00	9,40
	3,40	9,60	9,40	10,40	9,80	10,40
	4,80	9,20	10,40	11,00	10,60	11,00
	3,40	9,20	10,20	10,40	11,00	10,40
	4,60	11,00	11,20			9,40
Média	4,04	9,68	10,24	10,20	10,10	10,12

Teste de Kruskal-Wallis

$$H_{\text{crit}} = 11,07$$

$$H_{\text{calc}} = 12,96$$

$$H_{\text{corr}} = 13,11$$

H_{crit} - crítico

H_{calc} - calculado

H_{corr} - corrigido

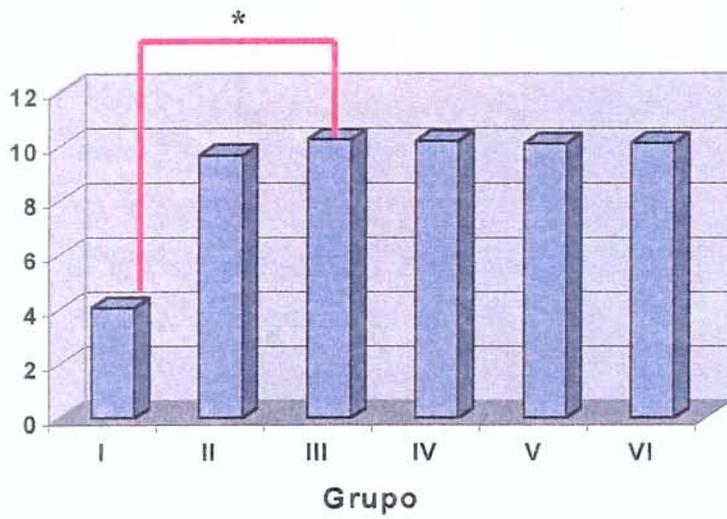
Teste de comparações múltiplas

PARES	VADMP	DMS
I, II	10,70	15,27
I, III	15,40*	15,27
I, IV	15,13	16,20
I, V	14,63	16,20
I, VI	14,50	15,27
II, III	4,70	15,27
II, IV	4,43	16,20
II, V	3,93	16,20
II, VI	3,80	15,27
III, IV	0,27	16,20
III, V	0,77	16,20
III, VI	0,90	15,27
IV, V	0,50	17,07
IV, VI	0,63	16,20
V, VI	0,13	16,20

VADMP - diferença calculada entre mediano dos postos

DMS - diferença mínima significativa

Gráfico 3. Média do índice mitótico (%) do vilo intestinal em relação aos grupos.



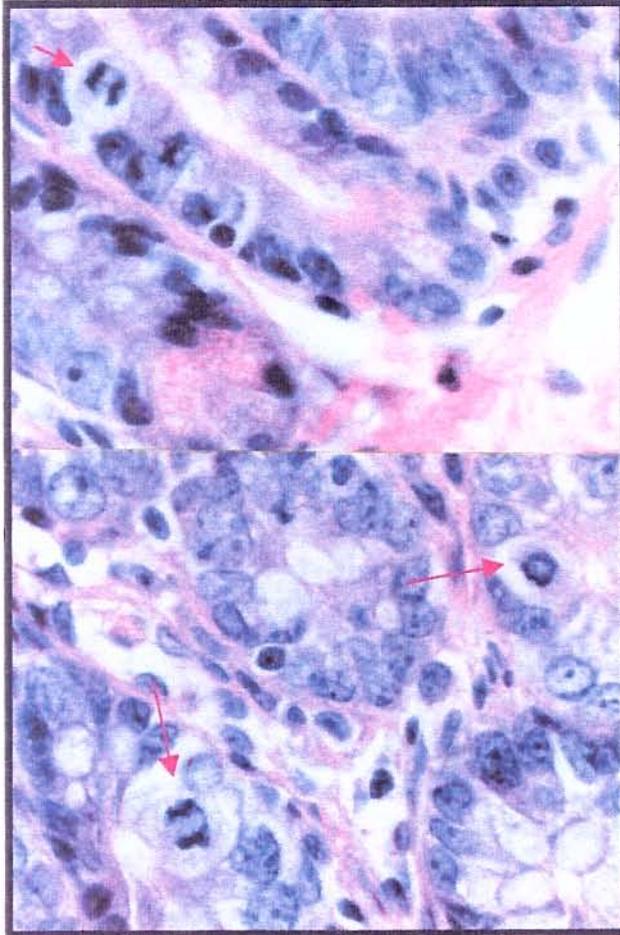


Figura 13 - Vilos intestinais de animais do grupo III submetido a 20 minutos de isquemia. Coloração H.E. . Aumento 1024x. Demonstrando figuras em mitose (setas).

6- DISCUSSÃO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA

As alterações causadas pela isquemia e o processo de reperfusão no intestino fez com que diversos autores desenvolvessem estudos, abordando este tema. Nesses trabalhos, constatou-se que as lesões no epitélio intestinal e suas alterações histopatológicas são proporcionais ao tempo de exposição destes tecidos à isquemia conforme **CHIU,1970;GRANGER et al,(1981); BOUNUS,(1982); PATEL, A.; KALEYA, R.N.; SAMMARTANO, R.J, (1992); ILLY & HAMAR; UDASSIN, VROMEN, HASKEL, (1994); SBRAGIA NETO (1996).**

HAGLUNG & LUNDGREN (1972) constataram ser possível a detecção de alterações no retículo endoplasmático com isquemia de 10 minutos. Após 15 minutos de isquemia, a mucosa do epitélio intestinal apresentava alterações na sua estrutura e com 30 minutos de isquemia as membranas basais são comprometidas, ocorrendo um aumento do espaço intra e extra celulares com lesão intensa no topo do vilo.

As mudanças qualitativas, que ocorreram no epitélio intestinal, após o processo de isquemia, foram observadas por alguns autores como **HAGLUNG & LUNDGREN,(1972); BATELLI, DELLA CORTE,**

STIRPE,(1972); SBRAGIA NETO, (1996). Segundo estes autores, a lesão ocorrida decorrente do processo de isquemia - reperfusão seguiria no sentido vilo intestinal para a cripta, sendo que o vilo apresentava uma maior sensibilidade ao processo isquêmico.

LUNDGREN & HAGLUNG (1978) sugerem que a lesão causada pela isquemia seria mais intensa no vilo, devido à diminuição do fluxo sanguíneo e da oxigenação ao topo do vilo. **BOUNUS (1987) e SBRAGIA NETO (1996)** observaram que a redução da mucosa é proporcional ao tempo de isquemia, caracterizando-se como mais intensa na fase de reperfusão. Dessa forma, sabe-se que o epitélio se reconstrói no sentido inverso, ou seja, da cripta para o vilo.

Para **RIJKE et al, 1976; RIJKE, R.P.C & GART, R. (1979)**, o vilo intestinal é a última porção do epitélio a sofrer regeneração pós isquemia, quando se analisa qualitativamente. Sabe-se ainda que a regeneração do epitélio é intensa e que para uma isquemia programada de 10 minutos **ILLY & HAMAR, (1992)** encontraram regeneração quase completa por volta de três horas de reperfusão.

No trabalho apresentado, foi realizada a exposição do epitélio intestinal a diversos tempos de isquemia, aumentando-os, gradativamente. A reperfusão

foi mantida sem variação para os diferentes grupos (24 horas). Inicialmente, foi estudada, qualitativamente, a regeneração, que pela classificação de Granger foi integral nos diferentes grupos de isquemia. Entretanto, ao se considerar os parâmetros morfométricos foram observadas alterações significativas como a diminuição do comprimento do vilô, aumento da largura e aumento do índice mitótico.

Dessa maneira, ao se avaliar o comprimento do vilô intestinal, observamos que os vilos do Grupo II (isquemia 10 minutos), do Grupo III (isquemia 20 minutos), do Grupo IV (isquemia 30 minutos) e do Grupo V (isquemia 40 minutos) não apresentaram diminuição do comprimento do vilô, estatisticamente significante, quando comparados com o Grupo I (controle). Porém o Grupo VI (isquemia 60 minutos) apresentou diminuição do comprimento do vilô, significante quando comparado com Grupo I. Observou-se ainda, nesta avaliação morfométrica, que, ao compararmos a diminuição do comprimento encontrado no Grupo IV (isquemia 30 minutos) e do Grupo V (isquemia 40 minutos) com relação ao Grupo controle (ausência de isquemia), estes valores se encontram próximos ao valor de significância estatística (15,30 para 16,20) e (14,93 para 16,20), respectivamente, sugerindo uma diminuição significante do comprimento. Ao se avaliar a diminuição do comprimento do

vilo intestinal entre os grupos submetidos à isquemia e não mais em relação ao controle, observamos: o Grupo II (isquemia 10 minutos) não apresenta diferença do comprimento do vilo estatisticamente significante, em relação ao Grupo III (20 minutos), ao Grupo IV (30 minutos) e ao Grupo V (40 minutos). Porém, ao se comparar o comprimento do vilo do Grupo II (isquemia 10 minutos) com o do Grupo VI (60 minutos), este último se apresentava com diminuição do comprimento do vilo estatisticamente significante. O Grupo III (isquemia 20 minutos) não apresentou diferença do comprimento do vilo estatisticamente significante, quando comparado com os outros grupos (II, IV, V, VI). O Grupo IV (isquemia 30 minutos) não apresenta diferença estatisticamente significante do comprimento quando comparado aos outros grupos (II, III, V, VI). O Grupo VI não apresenta diferença estatisticamente em relação com grupos (III, IV e V). Porém, como já mencionado, apresenta diminuição do comprimento do vilo significante, quando comparado aos vilos do Grupo II.

Ao se analisar o parâmetro de largura, observou-se que, os vilos do grupo VI apresentam-se com aumento estatisticamente significante, na largura quando comparados com o grupo I (controle). Os vilos dos grupos II, III, IV e V não apresentaram um aumento estatisticamente significante, quando

comparados com o Grupo I (controle). Ao se comparar a medida de largura entre os grupos submetidos à isquemia, excluindo o controle não foram encontradas diferenças significantes.

Dessa forma verificou-se em nosso estudo, que a análise quantitativa apresentou alterações morfológicas dos vilos intestinais, decorrentes da isquemia e reperfusão, que não foram detectadas na análise qualitativa. Apesar de nosso estudo ter demonstrado que o epitélio se encontra regenerado do ponto de vista qualitativo, ao analisarmos, quantitativamente, detectou-se, após 24 horas de reperfusão, alterações histopatológicas significativas como a diminuição do comprimento e aumento da largura. Acrescente-se ainda que foi encontrado um aumento da porcentagem de núcleos em mitose (índice mitótico) nos epitélios submetidos à isquemia e reperfusão, após 24 horas, em fase de regeneração. Notando-se ser estatisticamente significante quando foi comparado com o Grupo III em relação ao Grupo I (controle).

Dessa maneira pode-se inferir que a regeneração do vilo, através da mitose, se inicia imediatamente após a lesão isquêmica causada nos vilos.

Além das alterações histopatológicas qualitativas e quantitativas já observadas, diversos estudos apresentaram alterações bioquímicas e inflamatórias ocorridas após o processo da isquemia e principalmente da

reperfusão conforme. **GRISHAM, HERNANDEZ, GRANGER,(1986); HERNANDEZ et al (1987); KUBES et al (1990); ZAMBETIS & GROSSMAN; SIEMS et al (1991); FUJIMOTO et al (1991); LANGER, J.C & SOHAL, S.S., (1992).**

Os estudos de **PARKS et al (1982); HORTOW & WALKER (1993); VAN YE et al (1993)** sobre a importância dos radicais livres nas lesões causadas pela isquemia e reperfusão foram importantes para se conhecer o processo das alterações da isquemia e reperfusão. Esses estudos contribuíram também no sentido de possibilitar uma atuação efetiva com vistas a diminuir os efeitos danosos desencadeados pelos mesmos.

Dessa maneira, diversas formas de se atuar e diversos fármacos foram e continuam sendo utilizados para este objetivo. Dentre os fármacos utilizados, os “quelantes” dos radicais livres e as substâncias antioxidantes apresentam evidências de que podem diminuir as lesões provocadas pelo processo de isquemia e reperfusão, bem como prolongar o tempo de tolerância do intestino a este processo, conforme **BOORSTEIN, DACEY, CRONENWETT, (1988); BILBAO et al (1991); LEHMANN et al (1995); SCHLEIFFER & RAUL (1996); DESHMUKH et al (1997); NAKAMURA et al (1997); LEFER et al (1997).**

Mais recentemente, **YAGIHASHI et al (1998)**, utilizando-se da terapêutica obtida através da engenharia genética, demonstraram ser possível obtenção de benefícios na prevenção das lesões acarretadas pelo processo de isquemia e reperfusão. O nosso estudo demonstra a importância de se realizar a análise quantitativa para a avaliação das alterações causadas pela isquemia e a reperfusão, visto que a análise qualitativa, pode não ser suficiente para definir essas alterações. Salientamos a necessidade de se levar em conta as alterações morfométricas (quantitativas) e não somente as alterações qualitativas, como foi demonstrado em nosso estudo, para se avaliar os resultados das diversas formas de terapêuticas que possam minimizar as conseqüências ocorridas após o processo de isquemia e reperfusão.

7 - CONCLUSÃO

O estudo demonstrou que, do ponto de vista qualitativo, o epitélio intestinal se encontra regenerado, ao ser submetido a diferentes grupos de isquemia e reperfusão de 24 horas. Entretanto, observamos que, ao analisar a morfometria (análises quantitativas), considerando-se os parâmetros comprimento e largura do vilo e o índice mitótico, é possível a detecção de alterações significativas nos diferentes grupos. Estas alterações foram:

- diminuição do comprimento do vilo, sendo estatisticamente significativa quando comparamos o Grupo VI com os Grupos I e II;
- aumento da largura do vilo, sendo estatisticamente significativa quando comparamos o Grupo VI com o Grupo I;
- aumento do índice mitótico, sendo estatisticamente significativa quando comparamos o Grupo III com o Grupo I.

SUMMARY

Ischemia and reperfusion can entail several histopathological, biochemical, and inflammatory changes in the intestine. This study is intended to observe the changes which occur in the intestinal epithelium of rats, when submitted to the ischemia of varied time and scheduled reperfusion of 24 hours. For this purpose, the following groups were established:

Group I – control, Group II – 10 minutes ischemia, Group III – 20 minutes ischemia, Group IV – 30 minutes ischemia, Group V – 40 minutes ischemia, and Group VI – 60 minutes ischemia.

All groups were submitted to the same reperfusion time (24 hours), their intestines being resected for histopathological analysis. For the evaluation of possible differences among the groups previously defined, the variables length of the villus, width of the villus, and mitotic index were considered, applying the nonparametric test for averages of KRUSKAL-WALLIS, stressing that whenever there was statistical significance, this test was completed by the test of multiple comparisons. This study showed that, from the qualitative point of view, the intestinal epithelium is regenerated when submitted to different ischemia and reperfusion times of 24 hours. It was observed, however, that

when analysing the morphometry (quantitative analyses), taking villus length and width as well as mitotic index as parametre, meaningful alterations were detected. Such alterations are characterized by a diminution of the villus length and width as the ischemia time increased. It should be added that the mitotic index increased after the ischemia start (Group III being meaninful in relation to the control).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BATELLI, M.G.; DELLA CORTE, E.; STIRPE, E. - Xanthine oxidase type D (dehydrogenase) in the intestine and other organs of the rat. **Biochem, J.** 126 : 747, 1972.
2. BILBAO, J.; GARCIA-ALONSO I; PORTUGAL V; BARCELO, P.; ORTIZ, J.; M, NDEZ J. - Therapeutic usefulness of antioxidant drugs in experimental intestinal reperfusion syndrome. **Rev Esp Enfer Dig,** 80 (4) :237- 41, 1991.
3. BOORSTEIN, J.M.; DACEY, L.J.; CRONENWETT,J.L. - Pharmacologic treatment of occlusive mesenteric ischemia in rats. **J. Surg Res,** 44 (5) : 555-60, 1988 .
4. BOUNUS, G. - Acute necrosis of the intestinal mucosa. **Gastroenterology,** 82 :1457-1467, 1982.
5. CHIU, C.J.; McARDLE, A.H.; BROWN,R. et al- Intestinal mucosal lesions in low flow states. I. A morphological, hemodynamic and metabolic reappraisal. **Arch. Surg,** 101 : 478-483, 1970.
6. DESHMUKH, DR; MIROCHNITCHENKO, O.; GHOLE,V.S.; AGNESE, D.; SHAH, P.C.; REDELLI, M.; BROLIN, R.E.; INOUYE, M. -

- Intestinal ischemia and reperfusion injury in transgenic mice overexpressing copper-zinc superoxide dismutase. **Am J. Physiol**, 273 : C 1130-5, 1997.
7. FUJIMOTO, K.; GRANGER D.N.; PRICE, V.H.; TSO, P. - Ornithine decarboxylase is involved in repair of small intestine after ischemia-reperfusion in rats. **Am J. Physiol**, 261 (3 pt 1) : G 523-9, 1991.
8. GRANGER, D.N.; RUTILL, G.; McCORD, J.M. - Superoxide radicals in feline intestinal ischemia. **Gastroenterology**, 81 : 22-29, 1981.
9. GRANGER, D.N.; HOLLWARTH, M.E.; PARKS, D.A. - Ischemia-reperfusion injury : role of oxygen-derived free radicals. **Acta Physiol. Scand**, 548 : 47-63, 1986.
10. GRISHAM, B.M.; HERNANDEZ, L.A.; GRANGER, N. - Xantine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. **Am. J. Physiol.**, 251 : G 567-574, 1986.
11. HAGLUND, U & LUNDGREN, O. - Reactions within consecutive vascular sections of the small intestine of the cat during prolonged hypotension. **Acta Physiol. Scand.**, 84 :151-161, 1972.
12. HERNANDEZ, L.A.; GRISHAM, M.B.; TWOHIG, B.; ARFORS, K.E.; HARLAN, J.M.; NEIL GRANGER, D. - Role of neutrophils in

ischemia-reperfusion induced microvascular injury. **Am.J. Physiol.**,
253 : 699-703, 1987.

13.HOLANDER, M & Wolfe, D.A.In : - Non parametric statistical methods.

Editora : John Wiles & Sons. New York- 1973 - pg 503.

14.HORTON, J.W & WALKER, P.B. - Oxigen radicals, lipid peroxidation,
and permeability changes after intestinal ischemia and reperfusion. **J
Appl Physiol** ; 74 (4) : 1515- 20, 1993.

15.ILLY,S.G & HAMAR, J. - Sequence of morphological alterations in a
small intestinal ischaemia / Reperfusion model of the anesthetized rat.
A light microscopy study. **Int J Exp Pathol**; 73 (2) : 161-72, 1992 .

16.KUBES, P.; IBBOTSON, G.; RUSSELL, J.; WALLACE, J.L.;
GRANGER, D.N. -Role of platelet - Activating factor in ischemia /
reperfusion- induced leukocyte adherence. **Am J Physiol**; 259 (2
pt 1) : G 300-5, 1990 .

17.KURLAND, B.; BRANDT, L.J.; DELANY, H.M. - Diagnosis testes for
intestinal ischemia. **Sug. Clin. North Am.**, 72 : 85-105, 1992.

18.LANGER, J.C & SOHAL, S.S. - Increased mucosal permeability after
intestinal ischemia-reperfusion is mediated by local tissue factors. **J.
Pediatr. Surg.**, 27 : 329-332, 1992.

- 19.LEFER, D.J; SCALIA, R.; CAMPBELL, B.; NOSSULI, T.; HAYWARD, R.; SALAMON, M.; GRAYSON, J.; LEFER, A.M. - Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischemia- reperfusion injury in rats.**J Clin Invest**; 99 (4) : 684-91, 1997.
- 20.LEHMANN, C.; LUTHER, B.; HOLZ, A.; ROTH, S.; DAVID, H.; GRUNE, T.; SIEMS, W.; BURGER, K.; KOX, W.J. - Perioperative vascular flushing perfusion in acute mesenteric artery occlusion. **Eur J Vasc Endovasc Surg**; 10 (3) : 265-71, 1995 .
- 21.LUNDGREN, O. & HAGLUND, U. - The pathophysiology of the intestinal countercurrent exchanger. **Life Sci**, 23 : 1411-1422, 1978.
- 22.NAKAMURA, M.; OZAKI, M.; FUCHINOE, S.; TERAOKA, S.; OTA, K. - Ascorbic acid prevents ischemia - reperfusion injury in the rat small intestine. **Transpl Int**; 10 (2) : 89-95, 1997.
- 23.PARKS, D.A.; BULKLEY, G.B.; NEIL GRANGER, D.; HAMILTON-STANLEY, R.; McCORD JOE, M. - Ischemic injury in the cat small intestine : role of superoxide radicals. **Gastroenterology**, 82 : 9-15, 1982.

- 24.PATEL, A.; KALEYA, R.N.; SAMMARTANO, R.J. - Pathology of mesenteric ischemia. **Surg. Clin. North Am**, 72 : 31- 41, 1992.
- 25.RIJKE, R.P.C.; HANSON, W.R.; PLAISIER, H.M.; OSBORNE, J.W. - The effect of ischemic villus cell damage on crypt cell proliferation in the small intestine. **Gastroenterology**, 71 : 786-792, 1976.
- 26.RIJKE, R.P.C.; & GART, R. - Epitelial cell kinetics in the descending colon of rat. **Virchows Arch. B. Cell. Path.**, 31: 15-22, 1979.
- 27.SBRAGIA NETO, L. S. - Avaliação histológica e bioquímica das lesões de isquemia e reperfusão. Estudo no intestino de ratos. Dissertação de mestrado apresentada ao departamento de cirurgia ortopedia e traumatologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (USP), 1996.
- 28..SCHLEIFFER, R & RAUL, F. - Prophylactic administration of L-arginine improves the intestinal barrier function after mesenteric ischaemia. **Gut**; 39 (2) : 194-8, 1996.
- 29.SIEGEL, SIDNEY - In : Estatística não paramétrica (para a ciência do comportamento). Editora - **Mc Graw-Hill** - 1975- São Paulo pg 350.
- 30.SIEMS ,W.; GRUNE, T.; LEHMANN, C.; GEMKOW, O.; ANSORGE, K.; LUTHER, B.; GERBER,G. - Superoxide dismutase promotes ATP

and GTP restoration of rat small intestine during postischaemic reperfusion. **Pharmazie**; 46 (10) : 735-7,1991.

31.SNYDER, L.R. & KIRKLAND, J.J - Introduction to modern liquid chromatography. **Wiley Interscience Publications**, 1 st edition, USA, 1979.

32.UDASSIN, R.; VROMEN, A.; HASKEL, Y.- The time sequence of injury and recovery following transient reversible intestinal ischemia. **J Surg Res**; 56 (3) : 221-5, 1994 .

33.VAN YE, TM.; ROZA, A.M.; PIEPER, G.M.; HENDERSON, J. JR.; JOHNSON, C.P.; ADAMS, M.B. - Inhibition of intestinal lipid peroxidation does not minimize morphologic damage. **J Surg Res**; 55(5) : 553-8, 1993.

34.YAGIHASHI, A.; TSURUMA, T.; TARUMI, K.; KAMESHIMA, T.; YAJIMA, T.; YANAI, Y.; WATANABE, N.; HIRATA, K. - Prevention of small intestinal ischemia-reperfusion injury in rat by anti-cytokine induced neutrophil chemoattractant monoclonal antibody. **J Surg Res**;78 (2) : 92-6, 1998 .

35.ZAMBETIS, M. & GROSSMAN, H.J.- Effect of ischaemia on endothelium - dependent vasodilatation in the isolated rat superior mesenteric artery. **Br J Exp Pathol**; 69 (1) : 81- 90, 1998

APÉNDICE

Tabela 4. Lâminas com amostras do intestino de ratos do grupo I - Controle quanto ao comprimento (μm) e largura (μm) do vilô .

Amostras	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5
1	310-60	280-70	300-60	300-60	300-60
2	280-70	250-90	290-80	280-70	280-70
3	260-90	250-80	260-90	270-80	260-90
4	310-60	300-60	290-70	260-90	290-70
5	280-90	290-70	300-80	260-80	290-80
6	290-80	270-80	290-70	290-60	270-70
7	290-70	280-70	280-80	300-60	280-90
8	270-90	260-90	260-90	260-90	280-70
9	280-70	290-80	300-60	250-80	300-60
10	300-90	280-70	290-70	270-60	260-90

Tabela 5. Lâminas com amostras do intestino de ratos do grupo II (10 minutos de isquemia) quanto ao comprimento (μm) e largura (μm) do vilô .

Amostras	Rato 6	Rato 7	Rato 8B	Rato 9A	Rato 10
1	290-110	310-60	200-80	230-70	260-90
2	280-90	260-80	260-80	250-70	280-90
3	280-80	270-70	250-90	210-60	250-100
4	280-90	290-90	250-80	260-70	260-80
5	250-130	260-70	270-60	250-80	260-60
6	290-100	300-60	220-90	240-70	270-70
7	290-90	270-90	250-100	260-80	250-80
8	240-120	250-80	260-90	220-100	260-90
9	270-100	280-90	280-80	270-90	270-60
10	280-80	280-90	270-80	240-90	250-80

Tabela 6. Lâminas com amostras do intestino de ratos do grupo III (20 minutos de isquemia) quanto ao comprimento (μm) e largura (μm) do vilô.

Amostras	Rato 21	Rato 22	Rato 23	Rato 24	Rato 25
1	250-100	200-80	200-90	140-60	250-90
2	210-80	220-100	130-100	230-100	250-70
3	280-90	230-90	220-80	220-70	250-80
4	250-100	220-90	170-90	220-80	220-70
5	270-80	210-80	120-100	190-90	250-70
6	260-100	210-70	210-80	150-80	260-80
7	200-90	220-90	150-110	240-60	240-90
8	240-90	240-80	190-80	230-70	230-100
9	280-70	220-100	210-70	230-70	240-80
10	250-90	200-90	160-100	180-100	260-70

Tabela 7. Lâminas com amostras do intestino de ratos do grupo IV (30 minutos de isquemia) quanto ao comprimento (μm) e largura (μm) do vilô.

Amostras	Rato 11	Rato 12A	Rato 14	Rato 15
1	200-110	150-70	150-100	200-80
2	210-90	220-100	160-80	190-80
3	210-90	250-90	190-100	170-80
4	160-70	210-80	200-90	180-90
5	190-70	170-110	210-70	200-70
6	190-90	160-70	160-80	210-70
7	210-100	210-90	170-90	180-80
8	200-100	240-100	190-90	160-90
9	170-90	180-90	180-100	180-80
10	190-80	170-80	200-100	200-100

Tabela 8. Lâminas com amostras do intestino de ratos do grupo V (40 minutos de isquemia) quanto ao comprimento (μm) e largura (μm) do vilô.

Amostras	Rato 26	Rato 27A	Rato 28A	Rato 30
1	200-70	220-90	160-100	200-100
2	210-80	200-80	180-130	150-110
3	220-90	230-70	200-90	160-90
4	200-80	220-80	150-100	170-80
5	220-70	240-90	180-90	160-100
6	190-90	210-60	200-80	200-90
7	210-60	220-60	210-100	140-100
8	230-60	240-70	200-90	170-80
9	220-70	210-80	210-70	160-100
10	210-80	200-90	210-80	150-80

Tabela 9. Lâminas com amostras do intestino de ratos do grupo VI (60 minutos de isquemia) quanto ao comprimento (μm) e largura (μm) do vilô.

Amostras	Rato 16	Rato 17	Rato 18	Rato 19	Rato 20
1	170-80	200-80	220-90	200-90	210-80
2	160-90	180-90	180-80	210-80	170-90
3	180-80	170-100	170-60	170-100	150-100
4	150-100	160-100	150-100	190-80	160-100
5	190-90	150-90	160-110	170-100	150-110
6	150-100	190-80	140-110	160-90	170-90
7	180-110	180-110	170-80	150-90	180-80
8	170-80	170-80	180-90	160-80	190-70
9	160-70	150-100	170-90	170-100	150-100
10	160-100	170-80	160-80	160-100	160-80

Tabela 10. Lâminas com amostras do intestino de ratos do grupo I - Controle quanto ao número de figuras em mitose em 100 células.

Amostras	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5
1	03	03	04	03	03
2	04	04	05	02	04
3	02	05	06	07	06
4	05	02	07	02	07
5	06	03	02	03	03

Tabela 11. Lâminas com amostras do intestino de ratos do grupo II (10 minutos de isquemia) quanto ao número de figuras em mitose em 100 células.

Amostras	Rato 6	Rato 7	Rato 8B	Rato 9A	Rato 10
1	09	08	09	10	11
2	10	09	10	11	13
3	11	12	11	12	14
4	08	13	09	08	08
5	07	06	07	07	09

Tabela 12. Lâminas com amostras do intestino de ratos do grupo III (20 minutos de isquemia) quanto ao número de figuras em mitose em 100 células.

Amostras	Rato 21	Rato 22	Rato 23	Rato 24	Rato 25
1	11	07	12	09	15
2	12	08	09	08	09
3	10	09	08	13	12
4	08	11	11	14	11
5	09	12	12	07	09

Tabela 13. Lâminas com amostras do intestino de ratos do grupo IV (30 minutos de isquemia) quanto ao número de figuras em mitose em 100 células

Amostras	Rato 11	Rato 12	Rato 13	Rato 14	Rato 15
1	11	10	11	11	10
2	09	09	08	09	10
3	10	07	09	10	09
4	08	06	07	08	08
5	07	08	10	06	06

Tabela 14. Lâminas com amostras do intestino de ratos do grupo V (40 minutos de isquemia) quanto ao número de figuras em mitose em 100 células

Amostras	Rato 26	Rato 27A	Rato 28A	Rato 30
1	11	08	11	10
2	10	09	12	11
3	09	10	09	09
4	08	12	08	13
5	07	10	13	12

Tabela 15. Lâminas com amostras do intestino de ratos do grupo VI (60 minutos de isquemia) quanto ao número de figuras em mitose em 100 células.

Amostras	Rato 16	Rato 17	Rato 18	Rato 19	Rato 20
1	09	12	13	11	11
2	10	11	12	10	10
3	11	14	11	08	09
4	08	08	09	09	08
5	09	07	10	14	09