

PAULO HENRIQUE STAHLKE

**MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOTOXEMIA EM RATOS
SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO DE
MEMBROS CAUDAIS**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau acadêmico de Mestre.

Orientador:

Dr. João Carlos Domingues Repka.

Coordenador:

Dr. Antonio Carlos Ligocki Campos.

CURITIBA

2001

PAULO HENRIQUE STAHLKE

**MODELO EXPERIMENTAL DE ENDOTOXEMIA EM RATOS
SUBMETIDOS À ISQUEMIA E REPERFUSÃO DE
MEMBROS CAUDAIS**

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau acadêmico de Mestre.

Orientador:

Dr. João Carlos Domingues Repka.

Coordenador:

Dr. Antonio Carlos Ligocki Campos.

CURITIBA

2001

Dedico este estudo ao Professor Henrique Stahlke Jr., meu maior exemplo de médico, homem e pai.

Aos queridos

ROSA E JOSÉ DALLA BONA

LUCIANA

MARIZE

PAULO SERGIO

AVANY

AGRADECIMENTOS

Consigno aqui, cumprindo dever imperativo, os agradecimentos àqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para minha formação médica ou na execução deste trabalho.

- À Médica Luciana Gabardo Stahlke, amiga e esposa, sempre presente durante todas as etapas desta dissertação, pelo marcante auxílio, entusiasmo, presteza, assim como pelas palavras de incentivo e ânimo.
- Ao Professor Doutor João Carlos Domingues Repka, pelo valioso auxílio, orientações e infindável espírito acadêmico.
- Ao Professor Doutor Antonio Carlos Ligocki Campos, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, exemplo de seriedade e determinação, meu reconhecimento pela condução exemplar do curso e pelos valiosos ensinamentos dispensados a nós, sempre que solicitado.
- Ao Professor Doutor Osvaldo Malafaia, minha sincera gratidão pelo apoio sincero, amizade e oportunidade da realização do mestrado nesta renomada instituição.
- Ao Professor Virgílio Josué Balestro, pelo trabalho esmerado na correção gramatical e ortográfica desta dissertação.
- À Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, onde realizei minha graduação médica e os experimentos deste estudo, minha sincera gratidão, respeito e apreço.
- Ao Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, instituição que me acolheu durante a residência médica e onde aprendi tudo o que sei em cirurgia, minha eterna gratidão.
- Ao acadêmico da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, Edson Anselmo Silva Júnior, pela valiosa ajuda nos momentos da realização dos procedimentos cirúrgicos deste estudo.
- À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo que possibilitou a completa realização deste projeto.
- Aos técnicos de laboratório da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná: Erivan e Cleverson, pelo auxílio durante a fase experimental deste trabalho.

SUMÁRIO

	LISTA DE ABREVIATURAS	vi
	LISTA DE FIGURAS	viii
	LISTA DE TABELAS	ix
	LISTA DE GRÁFICOS	x
	RESUMO	xi
	ABSTRACT	xii
1	INTRODUÇÃO	1
1.1	OBJETIVO.....	3
2	REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1	ISQUEMIA E REPERFUSÃO.....	4
2.2	PROCESSOS FISIOPATOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO.....	9
2.3	ENDOTOXINA E ENDOTOXEMIA.....	20
3	MATERIAL E MÉTODO	35
3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	35
3.2	TÉCNICA OPERATÓRIA.....	36
3.2.1	GRUPO CONTROLE.....	38
3.2.2	GRUPO ISQUEMIA.....	38
3.2.3	GRUPO ISQUEMIA E REPERFUSÃO.....	39
3.3	AMOSTRAS SANGÜÍNEAS.....	41
3.4	DOSAGEM DE ENDOTOXINA.....	41
3.4.1	PRINCÍPIO.....	42
3.4.2	MATERIAIS.....	42
3.4.3	MÉTODO.....	42

SUMÁRIO

3.4.4	ANÁLISE QUALITATIVA DE ENDOTOXINA NAS AMOSTRAS DE PLASMA DE RATOS.....	45
3.4.5	ANÁLISE QUANTITATIVA DE ENDOTOXINA NAS AMOSTRAS DE PLASMA DE RATOS.....	45
3.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
4	RESULTADOS	47
4.1	DOSAGEM DE ENDOTOXINAS.....	47
5	DISCUSSÃO	50
6	CONCLUSÃO	61
	ANEXO	62
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

LISTA DE ABREVIATURAS

LPS	LIPOPOLISSACARÍDEO
TNF	FATOR DE NECROSE TUMORAL
PEG 4000 rad	POLIETILENOGLICOL 4000 RADIOATIVO
SRE	SISTEMA RETICULOENDOTELIAL
SSI	SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA
rpm	ROTAÇÕES POR MINUTO
UFC/g	UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA POR GRAMA
LAL	LISADO DE AMEBÓCITOS DE <i>LIMULUS</i>
M	MÉDIA
DP	DESVIO PADRÃO
Ig	IMUNOGLOBULINA
Log	LOGARITMO DECIMAL
UE	UNIDADES ENDOTÓXICAS
°C	GRAUS CELSIUS
ml	MILILITRO
μ	MICRA(O)
mm	MILÍMETRO
C	GRUPO CONTROLE
I	GRUPO ISQUEMIA
I/R	GRUPO ISQUEMIA E REPERFUSÃO
UE/ml	UNIDADE ENDOTÓXICA POR MILILITRO
p	NÍVEL DESCRITIVO DE SIGNIFICÂNCIA
ADP	DIFOSFATO DE ADENOSINA
AMP	MONOFOSFATO DE ADENOSINA
ATP	TRIFOSFATO DE ADENOSINA
CD	CLONE DE DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS
PAM	PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA
RNA	ÁCIDO RIBONUCLÉICO
IRC	ÍNDICE RESPIRATÓRIO DE CONTROLE
kDa	KILO DALTONS
ON	OXIDONÍTRICO

LISTA DE ABREVIATURAS

ONS	OXIDONÍTRICO-SINTETASE
I ₁₂₅	ISÓTOPO 125 DO IODO
⁵¹ Cr	ISÓTOPO 51 DO CROMO
SARA	SÍNDROME DA ANGÚSTIA RESPIRATÓRIA DO ADULTO
mCi	mili CURIE
FAP	FATOR AGREGADOR DE PLAQUETAS
ADP/O	DIFOSFATO DE ADENOSINA E OXIGÊNIO
¹⁴ C	ISÓTOPO 14 DO CARBONO
NAD ⁺	FORMA PROTONIZADA DA NICOTINAMIDA-ADENINA-DINUCLEOTÍDEO
NADH	NICOTINAMIDA-ADENINA-DINUCLEOTÍDEO-REDUZIDA
EDTA	ÁCIDO ETILENO-DIAMINO-TETRA-ACÉTICO
IL	INTERLEUCINA
MPO	MIELOPEROXIDASE
XO	XANTINA-OXIDASE
kg	KILOGRAMA
g	GRAMA
ng	NANOGRAMA (GRAMA x10 ⁻⁹)
AAS	ÁCIDO ACETILSALICÍLICO
C3	FATOR 3 DO SISTEMA COMPLEMENTO
C4	FATOR 4 DO SISTEMA COMPLEMENTO
C5	FATOR 5 DO SISTEMA COMPLEMENTO
TxA ₂	TROMBOXANO A ₂
LTB ₄	LEUCOTRIENO B ₄
EDRF	FATOR RELAXADOR DERIVADO DO ENDOTÉLIO
L-NAME	NITRO-L-ARGININA-METIL-ESTER
pH	POTENCIAL DE HIDROGÊNIO IÔNICO
μmol	MICRO MOL
mmol	MILI MOL
TGFβ	FATOR TRANSFORMADOR DO CRESCIMENTO β

LISTA DE FIGURAS

<u>FIGURA 1:</u>	ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS OBSTÁCULOS QUE PODEM DIFICULTAR A REPERFUSÃO DE TECIDOS ANIMAIS.....	7
<u>FIGURA 2:</u>	ASPECTO ILUSTRATIVO DA EXPOSIÇÃO ANIMAL EM DECÚBITO DORSAL.....	37
<u>FIGURA 3:</u>	ASPECTO ILUSTRATIVO DA FERIDA OPERATÓRIA COM A EXPOSIÇÃO DOS VASOS SANGÜÍNEOS: ARTÉRIA AORTA INFRA-RENAL (A) E VEIA CAVA (V).....	37
<u>FIGURA 4:</u>	ASPECTO ILUSTRATIVO DOS CLAMPES UTILIZADOS NESTE ESTUDO.....	39
<u>FIGURA 5:</u>	ASPECTO ILUSTRATIVO DO CLAMPEAMENTO DA ARTÉRIA AORTA ABAIXO DAS ARTÉRIAS RENAI.....	40
<u>FIGURA 6:</u>	ASPECTO ILUSTRATIVO DA FERIDA OPERATÓRIA NO FINAL DO EXPERIMENTO.....	40

LISTA DE TABELAS

<u>TABELA 1:</u>	DEMONSTRATIVO DAS DILUIÇÕES REALIZADAS A PARTIR DA SOLUÇÃO PADRÃO DE ENDOTOXINA.....	43
<u>TABELA 2:</u>	PESO CORPORAL MÉDIO EM GRAMAS DOS RATOS.....	47
<u>TABELA 3:</u>	DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINAS CIRCULANTES (UE/ml) NOS GRUPOS CONTROLE, ISQUEMIA E ISQUEMIA/REPERFUSÃO....	48
<u>TABELA 4:</u>	PESO DE TODOS OS ANIMAIS ESTUDADOS.....	62
<u>TABELA 5:</u>	DEMONSTRATIVO DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINAS SÉRICAS EM TODOS OS ANIMAIS.....	63

LISTA DE GRÁFICOS

<u>GRÁFICO 1:</u> DEMONSTRATIVO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PADRÃO DE ENDOTOXINA.....	44
<u>GRÁFICO 2:</u> DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINAS NOS GRUPOS ESTUDADOS.....	48
<u>GRÁFICO 3:</u> DEMONSTRATIVO DOS VALORES DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINAS DOS ANIMAIS.....	49

RESUMO

A permeabilidade intestinal às endotoxinas pode ser alterada em pacientes que são submetidos às cirurgias vasculares de grande porte. Os produtos da isquemia tecidual formados localmente nos tecidos e distribuídos na circulação sistêmica no período de reperfusão podem ser os responsáveis por esta alteração. O objetivo do presente estudo foi verificar a ocorrência de endotoxemia após indução de isquemia e reperfusão de membros caudais de ratos mediante o clampeamento da aorta abdominal infra-renal. Para tanto, realizou-se estudo experimental comparativo em grupos homogêneos de ratos machos. Foram utilizados 27 ratos da linhagem Wistar, divididos em três grupos, com nove animais cada, a saber: grupo Controle (C), grupo Isquemia (I) e grupo Isquemia e Reperfusão (I/R). Os ratos foram submetidos à laparotomia com dissecação dos vasos abdominais no grupo C, clampeamento da aorta infra-renal por duas horas no grupo I e, no grupo I/R, reperfusão dos membros caudais por duas horas após soltura dos clampes. Amostras de sangue total foram colhidas por punção cardíaca no início e fim dos procedimentos para a dosagem de endotoxinas pelo método do LAL. Os resultados demonstraram aumento dos níveis médios de endotoxinas no grupo Isquemia e Reperfusão no final do experimento ($0,034 \pm 0,0174$ UE/ml) significativos ($p < 0,001$) em relação aos grupos C e I, que não apresentaram endotoxemia no início e fim dos experimentos. Concluiu-se que foi necessário haver reperfusão dos membros caudais dos animais para se detectar endotoxemia pelo método do LAL; a isquemia somente não levou à detecção de endotoxinas por este método.

ABSTRACT

The gut permeability to endotoxins may be affected after major vascular surgery. The key of this process may be the noxious products that are released by the ischemic tissue to systemic circulation when happened the reperfusion. The aim of this study was to develop in mices ischemia and reperfusion of the lower limbs by the occlusion of the distal aortic with a clamp and verify if this process alters the endotoxemia. The study design was a comparative study with 3 groups of male Wistar rats. Male Wistar rats (n=27) were randomized to controls (C), ischemia alone (I) and ischemia and reperfusion (I/R). After laparotomy the animals, in group C, were submitted to dissection of the abdominal aortic to separate the fat and the periarterial tissue. The distal abdominal aortic were clamped in group I for 2 hours and, in group I/R, the aortic was clamped for 2 hours followed by 2 hours of the reperfusion after the released of the clamp. To evaluate the effects of this process, the whole blood were taken prior and after the surgery, to measure the endotoxin level by the Lymulus Amebocyte Lisate method. There was no endotoxemia in group C and I. Plasma endotoxin increased from not detected to 0,034 UE/ml in group I/R were occurred the reperfusion ($p<0,001$). The ischemia alone was not responsible for the endotoxemia when the distal aortic of the rats was clamped. The reperfusion of the lower limbs was necessary to detect the endotoxemia by the LAL method.

1-Introdução

A síndrome de disfunção de múltiplos órgãos é causa importante de mortalidade após trauma e cirurgias vasculares de grande porte como a cirurgia para correção do aneurisma aórtico infra-renal (OLSEN et al., 1991; SOONG et al., 1994). Esta síndrome, até recentemente, era considerada como complicação de infecções incontroláveis ou manifestação de foco séptico oculto. Atualmente é sabido que pode desenvolver-se na ausência de infecção (ERTEL, FRIEDL, TRENTZ, 1994; GORIS, BOEKHOLTZ, van BEBBER, 1986).

O desenvolvimento do quadro de sépsis e síndrome de disfunção de múltiplos órgãos em pacientes com estados críticos, na ausência de foco de infecção identificável, tem levado à hipótese de que o lúmen intestinal seja o responsável por estes processos por meio da translocação bacteriana. Vários autores (ALEXANDER et al., 1990; BAKER et al., 1998; BERG, 1992; BORDER et al., 1987; CARRICO et al., 1986; CORSON et al., 1992; DEITCH et al., 1989 B; LINDSAY et al., 1999; ROUMEN et al., 1993; van DEVENTER et al., 1988; WELLS et al., 1987) têm proposto a hipótese de que esta síndrome ocorra pelo fenômeno da translocação bacteriana. ALEXANDER et al. (1990) redefiniram translocação bacteriana como a passagem de microrganismos vivos ou mortos e seus produtos, como as endotoxinas, através de parede intestinal íntegra.

O trato gastrointestinal é normalmente habitado por grande quantidade de espécies microbianas e dispõe de alta concentração de endotoxinas. Estas são formadas por lipopolissacarídeos (LPS), que compõem a parede da membrana celular das bactérias Gram-negativas. Os LPS são formados por polissacarídeos e o lipídeo

"A". Este lipídeo é o principal mediador dos efeitos biológicos das endotoxinas, pode ativar: a cascata do complemento, gerar cininas vasoativas, induzir a formação de mediadores dos macrófagos, como a interleucina I e fator de necrose tumoral (BARRY et al., 1997 B; TRAYA, 1999).

Para proteger o hospedeiro da evasão de LPS, o intestino apresenta eficientes mecanismos de defesa, que constituem a barreira intestinal. Ela é formada por duas linhas de defesa. As células epiteliais, o muco, a secreção biliar e a presença da microflora intestinal normal correspondem à primeira linha de defesa contra a translocação bacteriana (TRAYA, 1999). Se eventualmente essa defesa inicial não conseguir evitar a passagem de bactérias e seus produtos para fora da luz intestinal, a segunda linha de defesa dita imunológica, entra em ação para tentar prevenir suas disseminações sistêmicas. Esta barreira é formada pelo tecido linfóide intestinal, leucócitos sangüíneos, células de Kupffer do fígado e imunoglobulinas séricas.

Evidências clínicas têm sugerido que a permeabilidade intestinal é alterada após cirurgias vasculares de grande porte. Endotoxinas podem ser encontradas no plasma destes pacientes após a correção de aneurismas da aorta torácica (HAFEZ et al., 2000) e abdominal (ROUMEN et al., 1993; SOONG et al., 1994; SVENSSON & CRAWFORD, 1997). A associação entre as lesões produzidas em membros pela isquemia e reperfusão, aumento de permeabilidade intestinal e o desenvolvimento de síndrome de falências de múltiplos órgãos, ainda não está totalmente entendida. Sabe-se que a reperfusão de um tecido isquêmico produz produtos danosos ao

organismo, que são lançados na circulação e poderão promover disfunções em órgãos distantes àqueles que sofreram inicialmente a isquemia.

Na literatura não se encontra modelo animal de endotoxemia realizado por meio de clampeamento de vasos abdominais para induzir isquemia e reperfusão de órgãos distantes do intestino. Salienta-se ainda que modelos animais, que simulam a oclusão sangüínea temporária, como a que ocorre em pacientes submetidos à cirurgias na aorta abdominal, não estudaram a presença de endotoxemia.

Este estudo experimental, baseado nos dados anteriormente citados, foi proposto para avaliar a ocorrência de endotoxemia após isquemia e reperfusão de membros caudais de ratos Wistar mediante o clampeamento da aorta infra-renal.

1.1 Objetivo

Os objetivos do presente estudo se consubstanciam no seguinte:

Desenvolver em ratos Wistar modelo de isquemia e reperfusão de membros caudais por meio do clampeamento da aorta infra-renal e verificar se os níveis sistêmicos de endotoxinas sofrem alterações.

2-Revisão da Literatura

A revisão apresentada a seguir está dividida em três partes: trabalhos sobre isquemia e reperfusão induzida em animais e seus efeitos, trabalhos que abordaram a fisiopatologia das lesões e aqueles que correlacionam endotoxemia com isquemia e reperfusão.

2.1. Isquemia e Reperfusão

ROSENTHAL (1943) realizou estudo pioneiro com isquemia e reperfusão em animais para induzir a síndrome do choque e testar terapias de reposição volêmica. Para desenvolver o choque o autor utilizou a técnica do torniquete que consistia em aplicar bandagens elásticas nas extremidades proximais dos membros dos animais. O autor aplicou este método em ratos e verificou que após 2 ou 3 horas de aplicação dos torniquetes, seguida de reperfusão, a mortalidade dos animais chegava a 95,3%. Quando o torniquete era aplicado por mais de 5 horas, havia importante redução da mortalidade. Relatou a ocorrência de mudanças nos padrões circulatórios, características da síndrome choque hipovolêmico, quando os torniquetes eram liberados. Para combater o choque, utilizou a terapia de reposição volêmica. Este método foi testado em ratos com 2 horas de aplicação dos torniquetes, seguida de reperfusão, após a soltura destes. A reposição volêmica foi realizada na dose igual a 15% do peso corporal dos animais e testaram-se: solução salina e soro de rato. A administração foi realizada 2 minutos após a liberação dos torniquetes. A solução salina isotônica foi efetiva em reduzir a mortalidade após o

choque obtido com a liberação do torniquete em comparação com o grupo controle e grupo que recebeu soro animal.

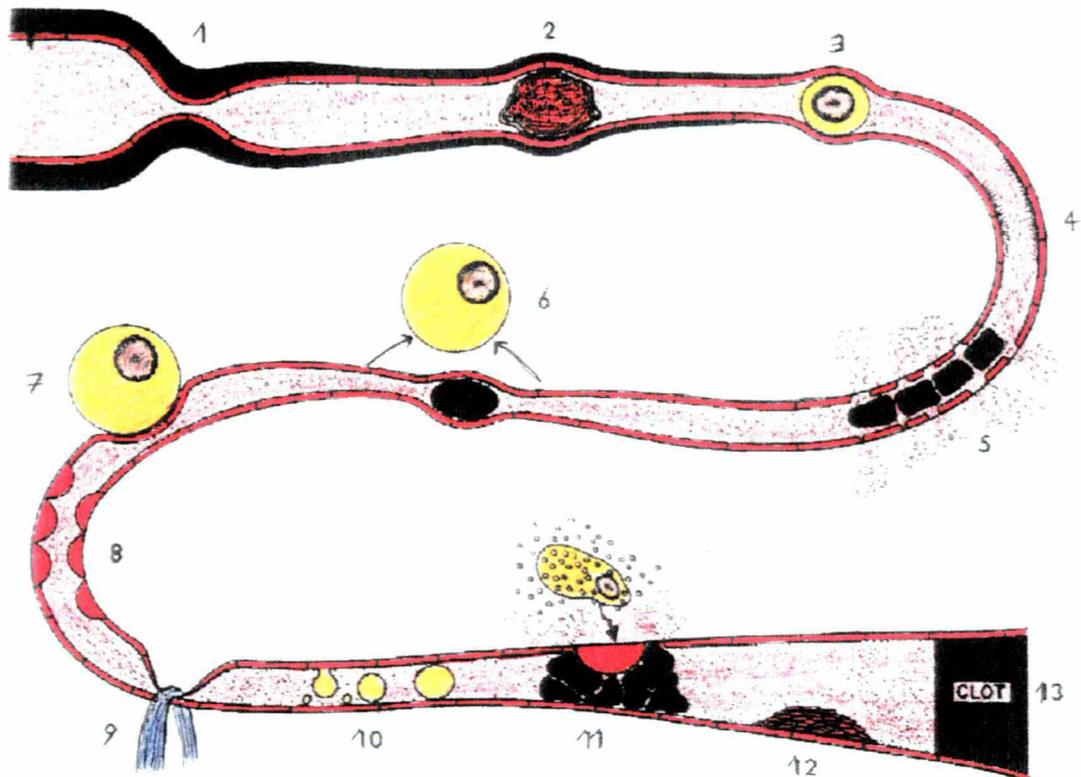
STROCK & MAJNO (1969 A) realizaram estudo com isquemia de membros de ratos baseados na técnica do torniquete de ROSENTHAL (1943). Os membros caudais dos animais foram mantidos com os torniquetes de 30 minutos a 8 horas. Os autores utilizaram um corante, que era injetado na veia caudal, para verificar a perviedade dos membros dos animais; este era injetado, quando os torniquetes eram liberados. Verificava-se a perviedade dos vasos sanguíneos com visão macroscópica e microscópica. Os resultados demonstraram que, após 30 minutos de isquemia até uma hora, não havia traços de refluxo sanguíneo para algumas áreas musculares. Após 2 horas de isquemia, havia várias áreas de fechamento de capilares e vênulas. Edema significativo apareceu após 30 minutos de isquemia, até o máximo de 4 horas e meia. Os autores testaram outro grupo de animais com heparinização sistêmica e não houve mudança significativa nos resultados. O fenômeno que chamaram de "não refluxo" desapareceu por completo, quando o período de isquemia foi de 30 minutos até duas horas de isquemia; após este tempo, havia áreas da musculatura que não reperfundiram mais. Em outro estudo (STROCK & MAJNO, 1969 B), utilizando microscopia eletrônica, os autores realizaram 2 horas e meia de isquemia e 30 minutos de reperfusão. Estudaram as lesões encontradas na microcirculação da musculatura esquelética dos membros dos animais, para explicar o "não refluxo". As lesões vasculares encontradas estão esquematizadas na figura 1. No término deste estudo, verificaram o seguinte: espasmo arteriolar, impactação de microêmbolos (agregados de eritrócitos ou de células mortas do local da obstrução) e glóbulos

brancos edemaciados, aderências ou rugosidades na face endotelial que poderia represar algumas células sangüíneas, lesão endotelial direta que levou à saída de líquido intravascular com impactação de hemáceas, estase sangüínea devido à perda de líquido para tecidos adjacentes, compressão dos microvasos por estruturas extrínsecas edemaciadas, edema endotelial, constrição capilar por bandas colágenas, formação de bolhas oriundas nas próprias células endoteliais, lesão endotelial por histamina oriunda da degranulação dos mastócitos, formação de trombos de plaquetas no início da reperfusão e coagulação sangüínea intravascular. Estes achados, segundo os autores, não ocorrem sempre todos juntos nos mesmos tecidos que sofreram isquemia e reperfusão, porque cada tecido tem suas características peculiares.

CARTER et al. (1998) desenvolveram um modelo murino para mimetizar o reparo, em humanos, do aneurisma da aorta abdominal por meio de clampeamento da aorta distal às artérias renais. Utilizaram camundongos BALB/c e camundongos com deficiência do complemento C5 DBA/2N. Os animais foram comparados após 72 horas da isquemia por meio de um escore subjetivo realizado com determinações bioquímicas, hematológicas e histopatológicas. Os resultados demonstraram significativo aumento nos escores clínicos de creatinofosfoquinase, desidrogenase-láctica e nos escores musculares em camundongos BALB/c em comparação com aqueles no grupo DBA/2N e no grupo controle. A histopatologia dos músculos quadríceps e tibial correlacionou-se com os sinais clínicos, níveis de creatinofosfoquinase e desidrogenase-láctica e foi indicativo da gravidade de patologia nestes grupos musculares. Foi verificado significativa redução em achados

clínicos, concentrações plasmáticas de enzimas e patologia muscular nos animais com deficiência de C5.

FIGURA-1: ESQUEMA ILUSTRATIVO DOS OBSTÁCULOS QUE PODEM DIFICULTAR A REPERFUSÃO DE TECIDOS ANIMAIS.



FONTE: Strock et al. (1969 B)

NOTA: Os números correspondem: a 1-espasmo arterial, 2-impactação de microêmbolos, 3-glóbulos brancos edemaciados, 4-face endotelial com rugosidades, 5-lesão direta endotelial, fragmentação e perda de fluido intravascular, 6-saída de líquido para células perivasculares com aumento da viscosidade sanguínea, 7-compressão extrínseca, 8-edema endotelial, 9-constrição por fibras colágenas que são esticadas pelo edema tecidual, 10-bolhas intravasculares, 11-ação das enzimas liberadas pelos mastócitos, 12-trombos plaquetários e 13-coagulação sanguínea.

ADAMS et al. (1995) estudaram os efeitos da pentoxifilina sobre a produção de fator agregador de plaquetas (FAP) em tecidos após a reperfusão sanguínea. Os autores realizaram o trabalho em cães. Os músculos dos membros sofreram 5 horas de isquemia e 20 horas de reperfusão. A pentoxifilina foi utilizada

na dose de 15 e 25 mg/kg respectivamente no grupo II e III, dez minutos antes da reperfusão. A quantidade de FAP foi medida na veia proximal da musculatura que sofreu a isquemia por meio do método de radioimunoensaio. Os resultados demonstraram que no grupo III a quantidade de FAP foi significativamente menor que no grupo controle (grupo I). A quantidade de necrose foi significativamente menor no grupo III em comparação com o grupo I. Os autores concluíram que a administração de pentoxifilina, na dose de 25 mg/kg antes da reperfusão de musculatura isquêmica, diminui a extensão de necrose e FAP.

APPEL et al. (1997), preocupados com o tempo de isquemia e com as lesões que os torniquetes utilizados em cirurgia podem causar, realizaram experimento com isquemia e reperfusão em ratos. Um grupo recebeu alopurinol e outro recebeu vitamina E. Mediu-se a quantidade de glutathione e de proteína dos músculos sóleos de cada membro dos animais. Os níveis de glutathione podem ser usados para avaliar a peroxidação lipídica, lesão oxidativa das membranas celulares, porque a glutathione-peroxidase e a catalase são enzimas que convertem o peróxido de hidrogênio em água e dióxido de carbono. Os músculos dos animais também foram examinados em microscopia eletrônica para avaliar alterações estruturais. Os resultados mostraram lesões oxidativas acentuadas no grupo controle. Nos grupos alopurinol e vitamina E estas alterações não ocorreram. Também no grupo controle houve aumento da quantidade de proteína por aumento da permeabilidade vascular o que não ocorreu nos outros grupos. Os autores concluem que a vitamina E e o alopurinol diminuem a ocorrência de estresse oxidativo e edema em musculatura esquelética pós-isquemia.

2.2. Processos Fisiopatológicos Envolvidos na Isquemia e Reperfusão

KERRIGAN & STOTLAND (1993) realizaram revisão da patofisiologia da lesão tecidual provocada pela isquemia e reperfusão. O evento inicial, a isquemia, leva o metabolismo celular a utilizar vias anaeróbicas na obtenção de energia. A falta de oxigênio faz com que diminua a energia celular. As alterações bioquímicas que se seguem levam à formação de metabólitos citoplasmáticos e à má função de sistemas de transporte através da membrana celular. Como exemplo, a concentração de cálcio intracelular aumenta. Este aumento também ocorre quando há a reperfusão, porque o sangue que está sendo reperfundido é rico em íons cálcio. Estes irão ativar enzimas que produzem mediadores pró-inflamatórios ("segundo gatilho"). Durante a fase de isquemia há acúmulo de substâncias inflamatórias nos tecidos que agem localmente. A reperfusão de tecidos isquêmicos pode continuar e, muitas vezes, agravar a lesão tecidual. A maioria dos trabalhos com enxertos miocutâneos enfocam o controle a ser implantado para os radicais de oxigênio que se acumulam nos tecidos. Entre estas substâncias estão as seguintes: o radical ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (HO). Ultimamente tem sido enfocado o papel das vias de produção do O_2^- : o sistema da xantina-oxidase e o sistema NADPH. Os autores verificaram que os radicais de oxigênio tóxicos são produzidos por PMN em maior quantidade no período de reperfusão e estes radicais são produzidos via sistema dependente do NADPH. Os radicais de oxigênio produzidos nos tecidos que sofreram isquemia e reperfusão levam a uma variedade

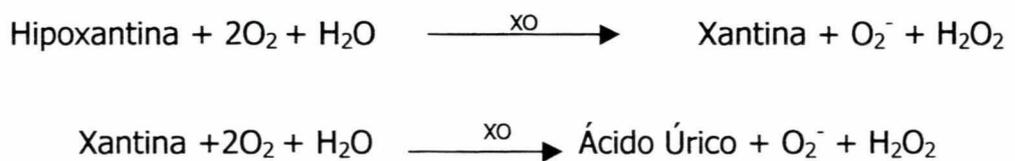
de alterações microvasculares, incluindo edema endotelial e aumento da permeabilidade capilar. Em adição a esses acontecimentos, a reperfusão tecidual aumenta a quantidade de cálcio intracelular, ativando a formação de várias enzimas. Estas aceleram a liberação e síntese de mediadores pró-inflamatórios como os seguintes: fator ativador de plaquetas (FAP) e compostos eicosanóides (leucotrienos, tromboxano, e prostaglandinas). O leucotrieno B4 e tromboxano A2 são, dentre estas substâncias, as mais importantes e os principais causadores das lesões teciduais. O FAP e leucotrieno B4 podem secundariamente ampliar a resposta inflamatória por ativar a produção de outros mediadores peptídicos como as citocinas, o fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas. O leucotrieno B4 é potente fator quimiotático, agregador de PMN ao endotélio e indutor da liberação de radicais livres de oxigênio e enzimas proteolíticas por estas estruturas. O tromboxano A2 é vasoconstritor e agregador de plaquetas e, por isso, pode dificultar o fluxo sanguíneo capilar durante a reperfusão. O fator ativador de plaquetas (FAP) aumenta a permeabilidade capilar e é produzido por muitos tipos de células envolvidas nos processos inflamatórios: PMN, células endoteliais, monócitos, eosinófilos, basófilos, mastócitos. Os efeitos do FAP são: promover a adesão e acúmulo das plaquetas, acumular e ativar leucócitos, aumentar a permeabilidade capilar, induzir vasoconstrição, modular a produção de citocinas.

GRACE et al. (1994) realizaram revisão sobre a lesão provocada pela isquemia e reperfusão. Neste trabalho os autores verificaram que as lesões teciduais seguidas à isquemia são bifásicas: a lesão inicia na fase de isquemia e sua exacerbação ocorre na fase de reperfusão. A lesão isquêmica ocorre pela depleção

de energia necessária para manter os gradientes iônicos dentro das estruturas celulares, o que levará à morte celular. A reperfusão é mediada pela interação de radicais livres, fatores endoteliais e neutrófilos. O radical mais danoso é o hidroxila, que é capaz de iniciar a peroxidação lipídica. O endotélio é um sistema dinâmico que produz vários agentes que regulam o ambiente local e podem induzir a quimiotaxia de neutrófilos, sua aderência e migração. Os mais importantes destes são os metabólitos do ácido araquidônico (prostaciclina, TxA_2 , LTB_4), EDRF, endotelina, fator agregador de plaquetas e complemento. A isquemia e reperfusão acaba com o delicado equilíbrio homeostático da microcirculação. O resultado é a atração, ativação, adesão e migração de PMN, causando lesão tecidual local pela liberação de proteases e radicais livres. A reperfusão também leva a dano sistêmico, especialmente pulmonar e cardíaco, mediados por substâncias tóxicas liberadas pelas células lesadas, como: íons potássio, ácido láctico, enzimas musculares e mioglobina. Os PMN ativados e seqüestrados na circulação pulmonar podem predispor o paciente a desenvolver SARA. Por outro lado, os tecidos possuem mecanismos de defesa contra as lesões produzidas pela isquemia e reperfusão. As defesas podem ser: carreadores e inibidores da produção de radicais livres, inibidores da ação lesiva dos PMN, agentes antioxidantes e hipotermia. Os carreadores de radicais livres são substâncias que interagem com os radicais, formando subprodutos menos lesivos, a superóxido-dismutase e a catalase são exemplos de carreadores endógenos. O alopurinol e a desferrioxamina são inibidoras da produção de radicais livres. A adenosina, $\text{TGF}\beta$ e anticorpos monoclonais são inibidores dos PMN. Os antioxidantes interrompem a peroxidação lipídica; a vitamina E, propranolol, bloqueadores dos

canais de cálcio e captopril são exemplos destas substâncias. Os autores concluem que para se limitar as conseqüências da isquemia e reperfusão deve-se atuar com múltiplas terapias.

ZIMMERMAN & GRANGER (1992) destacaram que os radicais livres de oxigênio, formados na reperfusão, danificam a arquitetura inteira das biomoléculas dos tecidos, alterando ácidos nucléicos, lipídeos da membrana celular, enzimas e receptores. A peroxidação dos lipídeos pode danificar a membrana celular e a célula perder sua compartimentalização. Carreadores de radicais de oxigênio não enzimáticos, como radical hidroxil, manitol, dimetil-sulfonida, dimetil-tiouréia, atenuam as lesões provocadas pela reperfusão. A xantina-oxidase é a enzima responsável pela degradação das purinas, as quais são oxidadas. Esta enzima tem o potencial de gerar peróxido de hidrogênio (H_2O_2) durante a oxidação da hypoxantina ou xantina.



FONTE: Zimmerman & Granger (1992).

A xantina-oxidase normalmente existe em tecidos normais, não isquêmicos, sob a forma de desidrogenase dependente de NAD^+ tipo D. Esta forma da enzima reduz a nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-íon (NAD^+) para NADH e não forma peróxido de hidrogênio ou radicais livres, porque não transfere elétrons para o

oxigênio. A xantina-desidrogenase tipo D é convertida à forma xantina-oxidase tipo O, produtora de radicais livres, durante a isquemia. Esta conversão pode ocorrer por dois mecanismos: conversão reversível pela oxidação e irreversível por proteólise. A conversão, durante o período isquêmico, pode ocorrer em diferentes escalas proporcionalmente com o tipo de tecido e tempo de isquemia. Este fato é importante, porque, quando ocorre a reperfusão, e o oxigênio se torna disponível para a célula, a xantina-oxidase utiliza-o ao invés do NAD^+ e produz peróxido de hidrogênio e radicais livres. O cálcio catalisa a conversão do tipo D para tipo O. Durante a isquemia, os níveis de ATP caem e acumula-se o AMP. O AMP é catabolizado e forma adenina, inosina e então hipoxantina. Hipoxantina e xantina são substratos para as reações da xantina desidrogenase e oxidase. Quando a reperfusão ocorre, a xantina-oxidase na presença de oxigênio forma grandes quantidades de radicais de oxigênio e peróxido de hidrogênio, o que resulta em dano tecidual. O peróxido de hidrogênio também é produzido diretamente por oxidases presentes nos peroxissomos (organelas citoplasmáticas que contém a enzima catalase). A glutation-peroxidase e catalase são enzimas metabólicas necessárias para a conversão do peróxido de hidrogênio em água e dióxido de carbono. A glutation-peroxidase possibilita que o glutation na sua forma reduzida converta o hidrogênio em radicais sulfidríla e hidroxila ou forme peróxido de hidrogênio. Os níveis de glutation podem ser usados como marcadores da formação de radicais livres após clampeamento aórtico (SVENSSON & CRAWFORD, 1997).

Os PMN são fonte de radicais livres de oxigênio. Estas células contêm NADPH-oxidase, que reduz o oxigênio molecular ao ânion superóxido. PMN ativados

também segregam enzimas como a mieloperoxidase (MPO), que catalisa a formação de ácido hipocloroso (HOCl) a partir do peróxido de hidrogênio e íon cloro. A reação química abaixo exemplifica o processo.



O ácido hipocloroso é um potente oxidante. Ele reage rapidamente com aminas primárias para produzir derivados que têm poder oxidante equivalente ao peróxido de hidrogênio. Os PMN ativados podem produzir um fluxo de 35 nmol/minuto por grama de tecido, que é extremamente citotóxico, e também liberam vários tipos de enzimas (elastase, colagenase), que lesionam as células parenquimatosas e a microcirculação. Os radicais oxidantes produzidos pela xantina-oxidase no endotélio e células epiteliais iniciam a produção e liberação de agentes pró-inflamatórios que atraem os PMN. Esta hipótese pode ser explicada, porque agentes como alopurinol, superóxido-dismutase, catalase, dimetiltiouréia e desferoxamina atenuam ambos: infiltração de PMN e a lesão microvascular induzida pela isquemia intestinal (ZIMMERMAN & GRANGER, 1992).

As membranas celulares de todos os animais são compostas por ácidos graxos poliinsaturados e fosfolípidos. Estes componentes são susceptíveis ao dano causado pelos peróxidos, o que pode resultar em alterações estruturais e funcionais

das membranas. Os radicais hidroxila têm importante ação lesiva sobre porção lipídica da membrana celular. Os radicais livres também promovem a ligação do radical sulfidril com moléculas de aminoácidos presentes no DNA, como: metionina, histidina, cistina, lisina e assim levar à fragmentação destas cadeias polipeptídicas. As reações dos radicais livres com a tiamina da cadeia do DNA produz pequenas quebras neste material genético e este dano pode levar à morte celular ou induzir degenerações malignas celulares. A peroxidação lipídica também inibe a síntese de prostaciclina e leva à contração dos vasos sanguíneos regionais e coagulação sanguínea, podendo assim, agravar a reperfusão (fenômeno de "não refluxo") e exacerbar os danos teciduais (STEPHENSON et al., 1995).

O ácido araquidônico produzido na peroxidação lipídica é convertido pela cicloxigenase a prostaglandinas, tromboxanos e prostacilinas. Estes produtos químicos têm efeitos na função plaquetária e no tônus vascular. A glutathion-peroxidase pode remover os níveis de hidroperóxidos e também reduzir a ativação da cicloxigenase. A glutathion-peroxidase necessita do substrato glutathion para agir; contudo os níveis de glutathion decrescem com a isquemia seguida de reperfusão. O ácido araquidônico é também convertido pela lipoxigenase em leucotrienos. Estes leucotrienos influenciam a agregação de PMN, a permeabilidade vascular e o tônus da musculatura lisa em muitos tecidos.

KNIGHT et al. (1997) estudaram a musculatura esquelética de ratos submetidos à isquemia e reperfusão. Os animais foram anestesiados e a isquemia foi induzida nos membros posteriores dos animais por meio de bandagens elásticas

colocadas nas coxas dos animais o mais proximal possível. O período de isquemia variou nos grupos de animais de meia hora até 2 horas e meia. Depois da remoção das bandagens e após a espera de 24 horas de reperfusão, anestesiaram-se os animais novamente para a retirada dos músculos gastrocnêmios dos membros submetidos à isquemia. A musculatura dos membros contralaterais foi utilizada como controle. Em outros grupos de animais o mesmo experimento foi feito com adição de agentes farmacológicos administrados intraperitonealmente 30 minutos antes da retirada das bandagens elásticas. Os agentes testados foram: nitro-L-arginina-metil-ester (L-NAME) na dose de 30 mg/kg e dexametasona (2,5 mg/kg) e num grupo controle foi injetado 1 ml de solução salina isotônica por quilograma de massa corporal. A vitalidade dos tecidos foi medida com o teste do cloreto de trifetil-tetrazolium que verifica a atividade enzimática fosforilativa mitocondrial. A quantidade de mieloperoxidase dos tecidos foi medida como sendo um índice de acúmulo tecidual de PMN. Os resultados mostraram que quanto maior o período de isquemia maior foi a redução na vitalidade tecidual medida pelo método do cloreto de trifetil-tetrazolium. Quanto maior foi o período de isquemia, maior a quantidade de água e de mieloperoxidase acumulada em comparação com os controles. Os animais tratados com inibidores da sintetase de ON (oxidonítrico), dexametasona e L- NAME, melhoraram a vitalidade tecidual em comparação com os grupos tratados com solução salina ($p < 0,05$).

O oxidonítrico é uma molécula inorgânica, um subproduto da conversão da L-arginina à L-citrulina por enzimas chamadas de oxidonítrico-sintetases (ONSs) (MICHAL, 1999). Em estados fisiológicos, o oxidonítrico é vasodilatador (EDRF)

envolvido na regulação do tônus dos vasos sangüíneos, apresenta propriedades de antiadesivo plaquetário, pode inibir a agregação de PMN e sua interação com o endotélio vascular. Durante a reperfusão sangüínea tissular, o oxidonítrico pode reagir com radicais superóxido e produzir o ânion peróxi-nitrito. O peróxi-nitrito tem meia vida curta e é precursor de radicais livres hidroxila que são altamente lesivos de tecidos orgânicos. O oxidonítrico pode proteger os rins de vasoconstritores endógenos, incluindo a endotelina e o tromboxano formados no processo de reperfusão tecidual. Há três tipos principais de oxidonítrico-sintetases (ONSs): ONSn neuronal (160 kDa), a ONSse endotelial (135 kDa) e a ONSsi induzida (130kDa) que é expressada continuamente sob certas circunstâncias em muitos tecidos orgânicos incluindo os rins. A ONSsi aparece quando há certas condições patológicas, quando a inflamação está sendo mediada por citocinas e endotelinas. Com o objetivo de investigar a resposta do oxidonítrico renal endógeno e a expressão de ONSsi (induzida), em face do clameamento e desclameamento aórtico, os autores, PARARAJASIGNAM et al. (1999), realizaram estudo em ratos. A aorta dos animais foi clameada abaixo das artérias renais por períodos de 30, 45 e 60 minutos. Os clampes foram retirados, esperou-se uma hora de reperfusão para fazer a nefrectomia. A filtração glomerular dos rins contralaterais dos animais foi determinada no segundo e no sétimo dia após a nefrectomia. Após isso os animais foram sacrificados para estudar os rins direitos (remanescentes). A atividade total da enzima oxidonítrico-sintetase (NOS) e induzida (NOSsi) foram determinadas nos tecidos renais após uma hora e sete dias de reperfusão. Os resultados mostraram que a filtração glomerular diminuiu no segundo e sétimo dia da operação em todos

os animais submetidos a clampeamento da aorta infra-renal, em comparação com controles ($p < 0,05$). A atividade da NOSs aumentou em uma hora e 7 dias nos animais submetidos ao clampeamento comparado com os controles ($p < 0,01$). A NOSsi foi detectada nos tecidos renais dos animais submetidos ao clampeamento da aorta após o sétimo dia da operação. Os autores concluem que o clampeamento da aorta infra-renal está associado com defeitos na filtração renal no período pós-operatório imediato e há intensificação no metabolismo do oxidonítrico com expressão da NOSsi.

WEISER et al. (1996) estudaram a patogênese da isquemia e reperfusão, utilizando camundongos deficientes em sistema complemento C3 e C4 e animais deficientes em imunoglobulinas séricas. Realizaram torniquetes nos membros posteriores dos animais e por meio de albumina radioativa determinaram o índice de permeabilidade vascular como medida de lesão tecidual. O índice de permeabilidade muscular em ratos normais foi de $2,47 \pm 0,19$ (grupo controle $0,15 \pm 0,01$), no grupo deficiente em C3 foi $1,25 \pm 0,11$. Estes valores foram significativamente menores que os do grupo normal ($p < 0,05$), porém, foram similares ao grupo deficiente em C4. Demonstrou-se que a via clássica de ativação do complemento é importante fator na inicialização do processo inflamatório vascular após a isquemia e reperfusão. Os ratos deficientes em imunoglobulinas séricas foram protegidos igualmente aos anteriores e esta proteção (à lesão vascular) foi revertida quando se administrou soro de rato normal. Os autores concluem que o experimento descreve um novo mecanismo para as lesões teciduais após isquemia e reperfusão, que envolve o

depósito e ativação de complemento, levando à inflamação e aumento de permeabilidade vascular.

HERNANDEZ et al. (1987) utilizaram modelo experimental em gatos para determinar se os PMN são os mediadores do aumento da permeabilidade vascular na isquemia e reperfusão (I/R). Administraram nos grupos de animais soro anti-neutrófilos, solução salina e anticorpo monoclonal específico para cadeia β do complexo CD18, que previne a aderência de PMN e sua saída dos capilares. Foi medida a permeabilidade intestinal a proteínas do plasma nos grupos controles e nos grupos de teste para 1 hora de isquemia seguida de reperfusão. Os resultados demonstraram que no grupo tratado com soro antineutrófilos e no grupo com anticorpo monoclonal a permeabilidade microvascular induzida pela I/R foi menor (respectivamente 0,13 e 0,12) em comparação com grupo controle (0,32) ($p < 0,05$). Os autores concluem que estes achados estão de acordo com estudos anteriores que apóiam a hipótese que os PMN, que se acumulam nos tecidos em resposta à ativação da xantina-oxidase, são os mediadores da lesão produzida pelos radicais de oxigênio na reperfusão tecidual.

Com o objetivo de investigar os efeitos sistêmicos da reperfusão de membros inferiores em ratos e o papel do aminoácido taurina, BARRY et al. (1997 A) realizaram estudo com modelo murino de oclusão da aorta abdominal por 30 minutos, seguida de reperfusão por 2 horas. Este aminoácido é antioxidante endógeno e é encontrado em grande quantidade em leucócitos humanos, principalmente nos PMN. O seu principal efeito *in vivo* é proteger as células

sangüíneas e tecidos contra o ataque dos oxidantes clorados como o ácido hipocloroso (HOCl). Para o desafio, os animais foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos com 10 animais cada: grupo controle, grupo reperfusão sem aminoácido taurina e grupo reperfusão com aminoácido taurina. A solução de aminoácido foi administrada oralmente 48 horas antes do experimento. Foi medido a infiltração de PMN e a permeabilidade vascular pela atividade da mieloperoxidase tecidual e pelos pesos secos e úmidos dos tecidos pulmonares, renais, cardíaco e esquelético. Os resultados demonstraram que a reperfusão resultou em lesão da microcirculação pulmonar e renal comprovadas por meio de edema tecidual destes órgãos. Os tecidos hepático, esquelético e cardíaco não foram afetados pela revascularização dos membros inferiores. O aminoácido taurina foi efetivo em prevenir a infiltração PMN pulmonar mas não a lesão microvascular renal. Os autores, com base nos resultados, sugerem que há outros mecanismos capazes de desenvolver dano endotelial tecidual além dos PMN, já que o aminoácido taurina bloqueou a oxidação dos PMN e mesmo assim houve lesão renal.

2.3. Endotoxina e Endotoxemia

ALEXANDER et al. (1990), em seu trabalho sobre translocação bacteriana, redefiniu este fenômeno como sendo a passagem de microorganismos viáveis e não viáveis pela mucosa intestinal e seus produtos como as endotoxinas. Vários fatores contribuem para aumentar a translocação bacteriana através da barreira intestinal. Estes incluem: 1-lesão direta dos enterócitos como ocorre com irradiações ou

endotoxinas; 2-redução do fluxo sangüíneo ao intestino, que pode ocorrer em choque hemorrágico, infecções, queimaduras e administração de endotoxinas; 3-aumento da quantidade de microorganismos que pode ocorrer em administrações de antibióticos ou antiácidos, seletivando flora bacteriana intestinal; 4-nutrição alterada que poderá ocorrer na administração de dietas elementares ou hiperalimentação parenteral. Os autores estudaram o processo de translocação bacteriana, utilizando *Candida albicans*, *Escherichia coli* ou endotoxina em alças intestinais de ratos e em cobaias. Com os animais anestesiados, realizou-se enterostomia de 10 cm de comprimento no íleo distal. A continuidade intestinal foi feita com anastomose intestinal término-terminal com fio prolene® 6-0. Realizaram-se lesões térmicas no corpo dos animais (queimadura de terceiro grau em 50% da área corporal) e instilaram-se os microorganismos e endotoxina nas alças intestinais. Os resultados demonstraram que a translocação de *C. albicans*, *E. coli* e endotoxina ocorreram por penetração direta nos enterócitos por meio de mecanismo desconhecido pelos autores. Este mecanismo não foi similar à fagocitose, porque os microorganismos e a endotoxina estavam presentes no citoplasma dos enterócitos sem um revestimento de membrana como ocorre na fagocitose. A translocação entre os enterócitos (através das junções intercelulares) não foi observada. A passagem de *C. albicans* na lâmina própria parece estar associada à descontinuidade da lâmina basal e extrusão do citoplasma das células. Os organismos na lâmina própria foram encontrados dentro de macrófagos (fagocitados) e também estavam livres em vasos linfáticos e sangüíneos. A endotoxina translocou por difusão através da lâmina própria e camada

muscular do intestino, passando, em maior quantidade entre os miócitos do que através deles até a serosa.

ALEXANDER et al. (1991) avaliaram a cinética bacteriana, sua distribuição tecidual e depósito de *E. coli* e de endotoxina translocados do intestino após lesão térmica. A cepa de *E. coli* utilizada cresceu na presença de glicose ^{14}C e desta cepa retirou-se a endotoxina. A *E. coli* (dose de 10^8 a 10^9 de bactéria por animal) e endotoxina (dose de 100 μg por animal) foram ministradas por sonda até a região estomacal de cada animal imediatamente antes da queimadura de 30% superfície corpórea. A translocação ocorreu extensivamente dentro de 1 hora após a lesão. Isto ocorreu com maior intensidade nos linfonodos mesentéricos, seguido pelo baço, pulmão e fígado. A translocação de endotoxina foi similar à translocação de bactéria intacta, com a exceção de que menos radioatividade foi verificada na cavidade peritoneal mas foi maior a radioatividade encontrada na região hepática. A morte das bactérias que translocaram foi maior nos linfonodos mesentéricos e baço (95 a 99%). Nos pulmões havia maior número de bactérias viáveis. Os autores concluem que a medida do número de bactérias viáveis num tecido não pode estimar a quantidade de translocação bacteriana.

KOIKE et al. (1994) estudaram ratos com a intenção de verificar se a endotoxemia produz falência de órgãos à distância. A intenção dos autores foi verificar se a isquemia e reperfusão intestinal resultam em endotoxemia e se a eliminação da endotoxina circulante atenua a ativação dos PMN e lesão pulmonar. O estudo foi prospectivo e randomizado. Os animais, anestesiados, foram submetidos à

oclusão da artéria mesentérica superior por 45 minutos e após liberação desta artéria esperou-se por 2 horas de reperfusão. Eliminou-se a endotoxina circulante com imunoglobulina (IgM) murina, E5 específica, na dose de 3 mg/kg administrada por via endovenosa antes do estudo. Com 2 horas de reperfusão a quantidade inicial de neutrófilos circulantes foi determinada pela diferença na produção de superóxido com e sem estímulo ativador. A seqüestração de neutrófilos no pulmão foi quantificada pela atividade da mieloperoxidase e pela razão entre a permeabilidade endotelial pulmonar e sangüínea da albumina I_{125} . As concentrações de endotoxina não foram significantes entre os grupos isquemia/reperfusão intestinal e grupo laparotomia. A isquemia e reperfusão intestinal leva ao aumento de neutrófilos circulantes e acúmulo de PMN em nível pulmonar. Com isso, pode haver lesão deste órgão. Esses achados ocorreram no grupo onde foi eliminada a endotoxina circulante. Os autores concluem que a isquemia e reperfusão iniciam a ativação de neutrófilos circulantes, produzindo lesão pulmonar por mecanismo independente da endotoxina.

HEEL et al. (1998) estudaram a adesina CD44, glicoproteína transmembrana, expressada na superfície de linfócitos e neutrófilos ativados por isquemia e reperfusão. Estas proteínas estão envolvidas nos processos inflamatórios, combinações célula-célula e célula-matriz, têm papel importante na migração de PMN e em metástases. Estudaram o efeito da isquemia e reperfusão sobre o CD 44 RNA mensageiro (RNAm) e a expressão imunohistoquímica do CD 44 no intestino delgado de ratos em dois grupos de animais. O primeiro grupo foi submetido à cirurgia sem oclusão da aorta; o segundo grupo foi submetido à oclusão da aorta

supra-renal por 1 hora seguida de 1 hora de reperfusão. Padronizaram segmentos de intestino delgado e jejuno, quanto à quantidade de proteína na mucosa, DNA, expressão de RNAm e de CD 44 e a expressão imunohistoquímica de CD 44. Os resultados demonstraram que a reperfusão lesionou mais a mucosa que só a isquemia. A expressão da proteína CD 44 na superfície celular foi significativamente menor após o período de isquemia e isto foi coincidente com a diminuição na quantidade citoplasmática de CD 44 RNAm nos enterócitos isolados. Conclui-se que a lesão determinada pela isquemia e reperfusão diminui a expressão de CD 44 dentro da mucosa jejunal e isto poderá contribuir para as lesões da barreira mucosa intestinal.

WELLS et al.(1987) estudaram o papel dos macrófagos na translocação bacteriana. Os autores utilizaram grupos de camundongos imunocompetentes e com imunodeficiência para fator complemento C3H/ HeJ (defeito nos macrófagos). Foi administrado bacitracina e estreptomicina, junto com a água, para os animais com a intenção de eliminar a maioria da microflora intestinal. Estes camundongos foram colonizados com cepas de *Escherichia coli* resistente à estreptomicina. Dois dias após a *E. coli* estava presente em todos os animais na concentração de 10^{11} por grama de fezes no intestino grosso. Em 4 experimentos separados a *E. coli* estava em 100% dos linfonodos mesentéricos dos animais imunocompetentes e em 10%, 40%, 30% e 50% dos linfonodos dos imunodependentes. Foi realizada descontaminação antibiótica nos animais pela administração de *E. coli* marcada com fluoresceína antibiótico-resistente administradas na água dos animais. Foram estudados grupos de coorte onde foi administrado fluoresceína marcada em fragmentos de látex de um

micrômetro. Após duas horas, quatro e onze dias os linfonodos mesentéricos foram retirados. Destes, examinou-se, uma suspensão celular analisada num separador celular ativado pela fluoresceína. A fluoresceína marcada foi detectada exclusivamente na população de macrófagos esterase positivo. Estes resultados sugerem a hipótese de que os macrófagos intestinais podem desempenhar um papel decisivo no transporte de partículas intestinais (incluindo bactérias) para locais extraintestinais.

GRANGER (1988) descreveu o papel dos PMN e xantina-oxidase na lesão induzida pela isquemia e reperfusão. O autor relata que a reperfusão reintroduz o oxigênio no tecido isquêmico e este seria o principal responsável pela lesão tecidual. Havia sido demonstrado anteriormente, pelo autor, que a lesão na mucosa intestinal produzida por 3 horas de isquemia e 1 hora de reperfusão é significativamente maior que aquela produzida por 4 horas de isquemia sem reperfusão e também, a reperfusão de intestinos com perfusato desoxigenado após 3 horas de isquemia produziu menos lesão que quando reperfundido com sangue total. Os inibidores da xantina-oxidase desempenham importante papel em diminuir as lesões provocadas durante a reperfusão. O alopurinol, oxipurinol são drogas utilizadas por via endovenosa capazes de atenuar lesões intestinais em animais de laboratório provocadas pela reperfusão. Pela via entérica, o aldeído ptérico e o ácido fólico reduzem a permeabilidade microvascular intestinal provocada pela isquemia/reperfusão.

YASSIN et al. (1996) realizaram estudos com ratos, onde, o efeito da isquemia e reperfusão era verificado no intestino e na corrente circulatória. Para

tanto, realizaram isquemia nos membros posteriores dos animais seguido de reperfusão. Avaliaram: mortalidade dos animais, estrutura morfológica intestinal, concentração de endotoxina sistêmica e a concentração plasmática de citocina IL-6. Utilizaram 60 ratos Wistar machos. A isquemia era realizada por meio de torniquetes: bandagens elásticas colocadas em ambos os membros posteriores dos animais na região da coxa. Após o período de isquemia, a reperfusão dos membros era obtida pela liberação dos torniquetes. No experimento 1 estudaram o grau de sobrevivência do grupo controle comparado com o grupo submetido à isquemia e reperfusão. Os animais foram observados por 4 dias. No experimento 2 havia 3 grupos de animais com 12 animais cada. Grupo controle, grupo isquemia e grupo isquemia e reperfusão. Nestes eram colhidas amostras de sangue para dosar endotoxina sistêmica e concentrações de IL-6. Amostras de intestino delgado e grosso foram retirados para se obter estudo morfométrico da mucosa intestinal. Os resultados demonstraram que a mortalidade aumentou significativamente, após 24 horas de reperfusão, aumento de 50% ($p < 0,05$); em 72 horas, aumento de 70% na mortalidade ($p < 0,005$). A espessura da mucosa intestinal, tanto do intestino delgado quanto do intestino grosso, tiveram significativo decréscimo no grupo submetido a 3 horas de isquemia seguido de 2 horas de reperfusão em comparação com o grupo controle e grupo submetido só à isquemia ($p < 0,01$). Endotoxina plasmática aumentou significativamente nos animais do grupo isquemia com duas horas de reperfusão ($44,8 \pm 19,2$ pg/ml) em relação ao grupo controle ($p < 0,05$); o mesmo ocorreu com os níveis de IL-6. Os autores concluem que a reperfusão de uma

extremidade se acompanha de eventos intestinais que podem produzir resposta inflamatória sistêmica gerada por endotoxina de origem intestinal.

Os mesmos autores (YASSIN et al., 1997), posteriormente, determinaram o efeito da isquemia e reperfusão em membros posteriores de ratos Wistar sobre a mucosa intestinal. Foi verificada sua estrutura e infiltração de PMN com o intuito de estabelecer o grau de lesão intestinal após indução de lesão isquêmica em órgão distante dos intestinos. Foi verificada microscopia eletrônica da mucosa intestinal, intestinos delgado e grosso, nos cinco grupos de animais: controle, grupo submetido só a anestesia, grupo só submetido a três horas de isquemia, grupo isquemia e uma hora de reperfusão, grupo isquemia e duas horas de reperfusão e grupo isquemia e três horas de reperfusão. A avaliação histológica foi determinada por patologista que desconhecia o experimento. Para cada animal realizaram-se vinte medições dos parâmetros morfométricos intestinais: espessura total da mucosa, média de altura das vilosidades intestinais e da profundidade das criptas. Foi medido o número de PMN na lâmina própria de cada uma destas áreas intestinais para se estabelecer a quantidade de PMN por mm^2 . A permeabilidade intestinal dos ratos normais foi previamente determinada em modelo de estudo chamado de "saco intestinal invertido". Neste modelo utilizou-se ^{14}C marcado com polietilenoglicol 4000 (PEG 4000 rad). Os resultados mostraram significativo decréscimo na média da espessura da mucosa do intestino delgado nos animais submetidos à isquemia e com duas horas de reperfusão em comparação com o grupo controle. A profundidade das criptas diminuiu significativamente em animais submetidos à isquemia seguida de 2 horas e 3 horas de reperfusão em comparação com o grupo controle. No intestino

grosso não foi detectada diferença na média da espessura da mucosa ou na profundidade das criptas em comparação com o grupo controle. A contagem de PMN não mostrou significância entre os grupos controle em relação com os experimentais, tanto no intestino delgado quanto no intestino grosso. A permeabilidade intestinal aumentou significativamente no grupo isquemia, a que se seguiram de 2 horas de reperfusão, em relação ao grupo controle. O aumento de permeabilidade que ocorreu nos grupos com reperfusão afetou todos os segmentos intestinais. Os autores concluíram que a estrutura intestinal e permeabilidade podem ser alteradas com a reperfusão de órgãos distantes ao intestino, o que pode explicar relatos de endotoxemia em pacientes submetidos à cirurgia para corrigir aneurismas da aorta abdominal que evoluíram a óbito com complicações sistêmicas e falência de múltiplos órgãos.

Os autores, YASSIN et al. (1998), quantificaram a endotoxina sérica por meio de espectrofotometria e de teste imuno-enzimático, bem como determinaram a quantidade de anticorpo antiendotoxina. Estas determinações foram realizadas em cinco grupos de ratos. A isquemia seguida de reperfusão por uma, duas e três horas induziu significativo aumento de endotoxina, respectivamente: média de 10, 44,8 e 20,2 pg/ml comparados com aos controles 2,58 pg/ml e aos animais submetidos somente à isquemia 1,2 pg/ml ($p < 0,05$). Este fato foi associado com significativa redução na concentração de anticorpos antiendotoxina (imunoglobulinas IgG e IgM). Não houve translocação bacteriana detectada em nenhum grupo estudado. Os autores concluem que apenas a isquemia e reperfusão de membros caudais de ratos,

na ausência de infecção ou translocação bacteriana, é responsável pela ocorrência de endotoxemia.

CORSON et al. (1992) realizaram trabalho com o propósito de testar se a isquemia e reperfusão de membros caudais de animais afetava a permeabilidade intestinal. Os autores utilizaram 30 ratos Wistar divididos em: grupo controle (grupo I com 10 animais), grupo onde houve 3 horas de isquemia (grupo II), grupo isquemia por 15 minutos seguido de 15 minutos de reperfusão (grupo III), grupo isquemia por 3 horas seguido de 2 horas de reperfusão (grupo IV). Os autores, ainda, testaram um quinto grupo, onde se estudaram os efeitos da hipotensão sobre a permeabilidade intestinal. Neste grupo, os animais, foram submetidos à infusão de nitroprussiato de sódio para manter a PAM ao redor de 75 mmHG. A isquemia foi realizada pelo método do torniquete com bandagem elástica na região proximal dos membros caudais dos animais. Para verificar a permeabilidade intestinal, os autores utilizaram segmento de intestino delgado (íleo terminal), que foi isolado com ligaduras de fio de seda. Neste foi administrado peroxidase (Sigma®) em 1 ml de solução salina 0,9% quinze minutos antes do sacrifício. Este segmento era retirado e preparado para ser examinado por microscopia eletrônica para verificar a ocorrência de rupturas na mucosa e evidências de penetração de peroxidase além das junções intercelulares dos enterócitos. Mediu-se também a endotoxina plasmática dos animais no início e após o fim do experimento. Os autores verificaram que a PAM dos animais sofria abrupta queda quando eram liberados os torniquetes (118 ± 3 mmHg para $81 \pm$ mmHg), este fato foi simulado no grupo V com a administração de nitroprussiato de sódio. Na microscopia eletrônica verificou-se que a penetração da

peroxidase na alça estudada foi evidente em 1 animal de cada um dos grupos I,II e III e em todos os animais submetidos à isquemia e reperfusão (grupo IV). No grupo submetido à hipotensão (grupo V) não se evidenciou penetração de peroxidase além das junções intercelulares em todos os animais. Os níveis de endotoxinas circulantes aumentaram significativamente no grupo V em comparação com os grupos I,II e III. Os autores concluíram que os danos na mucosa intestinal são os responsáveis pela endotoxemia pós-isquemia e reperfusão e que estes danos não são atribuídos à hipotensão que ocorre no período de reperfusão.

SCHUMER et al. (1970) realizaram estudo para verificar se a presença de endotoxina de *Escherichia coli* dificultava a respiração mitocondrial (oxidação fosforilativa). Os autores, inicialmente, realizaram biópsias em fígados de pacientes que seriam submetidos à cirurgia das vias biliares. Posteriormente, injetaram LPS de *E. coli* 026:B6 (Difco Laboratories®) intraperitonealmente em ratos. O grupo controle dos animais recebeu soro pela mesma via. Após 18 horas, os animais foram sacrificados para se examinarem os fígados. As células hepáticas humanas foram separadas, a metade foi colocada *in vitro* com endotoxina e a outra parte serviu como controle. Mediu-se o consumo de oxigênio mitocondrial destes hepatócitos. Calculou-se a razão entre difosfato de adenosina e oxigênio (ADP/O) e o índice respiratório de controle (IRC). O IRC é igual à quantidade de oxigênio absorvida pela presença de ADP, dividida pela quantidade de oxigênio sem ADP. Os resultados demonstraram que na presença de ADP a mitocôndria humana e a de rato com endotoxina tiveram absorção menor de oxigênio que os grupos sem endotoxina; contudo na ausência de ADP não houve diferenças significativas nos débitos

respiratórios entre os grupos. Ambos IRC e ADP/O foram significativamente maiores para os grupos controles. Os autores verificaram alterações nas organelas citoplasmáticas na microscopia eletrônica dos grupos, onde a endotoxina estava presente; concluíram que a endotoxina de *E. coli* dificulta a respiração mitocondrial tanto *in vitro* quanto *in vivo* e que há forte correlação entre os dados de consumo de oxigênio e as alterações observadas pela microscopia eletrônica.

Com o objetivo de determinar o papel das citocinas e da ativação do sistema complemento na patogênese das lesões da mucosa intestinal induzidas por endotoxinas em translocação bacteriana, assim como para quantificar a magnitude da permeabilidade da mucosa intestinal induzida por endotoxinas, DEITCH et al. (1989 A) realizaram estudo em que utilizaram camundongos e ratos Sprague-Dawley. Para cumprir o primeiro objetivo, foram utilizados 2 grupos de experimentos. No grupo I foi mensurada a capacidade da endotoxina de induzir translocação bacteriana em camundongos hiporresponsivos a endotoxinas, ou com deficiência de complemento. Camundongos heterogênicos foram usados para controle. No grupo II foi utilizado um anticorpo policlonal anti-TNF, para prevenir translocação bacteriana, induzida por endotoxina. Nestes dois grupos, os camundongos receberam injeção de endotoxina de *Escherichia coli*, nas doses de 0,05 a 0,50mg por animal, ou injeção de solução salina isotônica (SSI). O anticorpo anti-TNF foi administrado 6 horas após a injeção de endotoxina ou SSI. Vinte e quatro horas após a injeção de endotoxina ou SSI, os camundongos foram sacrificados. Durante o sacrifício foi coletado sangue para dosagem de TNF. Também foram coletados o linfonodo mesentérico e ceco para cultura, e fragmento do íleo

para estudo histológico. Para a realização do segundo objetivo, isto é, a avaliação da permeabilidade da mucosa intestinal induzida por endotoxina, foram utilizados ratos, que durante a anestesia foram distribuídos aleatoriamente. Um grupo recebeu injeção de endotoxina de *Escherichia coli* (dose de 0,05 a 0,50mg); e o outro, injeção de SSI. Foi realizado a seguir, laparotomia com isolamento de segmento de 10 cm de jejuno e íleo. Cada um destes segmentos foi cateterizado proximal e distalmente. Após as lavagens destes segmentos, as áreas isoladas retornaram para a cavidade. Uma hora após a anestesia e injeção de SSI ou endotoxina, foi injetado 75 mCi de ⁵¹Cr EDTA na artéria carótida. O experimento durou 2 horas; durante este período, foi coletado sangue a cada 60 minutos, e líquido de perfusão intestinal a cada 10 minutos. Também foi avaliada o tratamento prévio com alopurinol para prevenir o aumento da permeabilidade intestinal. Para isto, foi administrado alopurinol (dose 50 mg/kg) 24 ou 48 horas antes da injeção de SSI ou endotoxina. Todos os camundongos que receberam endotoxina (hiporresponsivos, deficiência de complemento e controle), apresentaram translocação bacteriana para linfonodo mesentérico numa porcentagem significativa, enquanto os que receberam injeção com SSI apresentaram linfonodos estéreis. A maioria dos camundongos que receberam endotoxina apresentavam edema das vilosidades, no estudo histológico do íleo. O fato de a translocação bacteriana ocorrer nos camundongos hiporresponsivos à endotoxina, e naqueles com deficiência de complemento, indica que nem a liberação de produtos de macrófagos, nem a ativação do complemento são essenciais para que ocorra a translocação induzida por endotoxina. Este fato foi reforçado pela observação de que, embora o tratamento prévio com anticorpo anti-

TNF tenha sido efetivo em reduzir os níveis de TNF no plasma dos animais com injeção de endotoxina, não preveniu a translocação bacteriana induzida pela endotoxina. Com relação à permeabilidade intestinal, 2 horas após a injeção de endotoxina, houve evidência de aumento da permeabilidade ileal, mas não a jejunal, medido pelo aumento da liberação do ^{51}Cr EDTA. Este aumento na permeabilidade ileal e na translocação bacteriana induzida por endotoxina poderiam ser prevenidos com a administração prévia de alopurinol, uma vez que ele foi efetivo em diminuir a incidência de translocação bacteriana e a permeabilidade intestinal quando comparados com os animais que não receberam a droga. O alopurinol, inibidor competitivo da xantina-oxidase, previne a translocação e o aumento da permeabilidade intestinal, induzidos por endotoxina: isto sugere que a endotoxina promove translocação bacteriana primariamente por alterações da permeabilidade intestinal.

O'DWYER et al. (1988), para estudar os efeitos da endotoxina na barreira intestinal, realizaram trabalho em 12 pessoas saudáveis. Aleatoriamente, os autores, administraram endotoxina de *Escherichia coli* (dose de 4 ng/kg) e solução salina. Lactulose e manitol foram dados aos pacientes por via oral 30 minutos antes e 120 minutos após a endotoxina. Para quantificar a permeabilidade intestinal mediu-se a excreção renal destas substâncias nas 12 horas subsequentes. Após a administração sistêmica de endotoxina, a excreção de lactulose aumentou quase que duas vezes (média de 263 ± 36 μmol por 12 horas contra 145 ± 19 μmol por 12 horas durante administração de solução salina). A absorção de manitol teve comportamento similar porém com menor variação ($5,7 \pm 0,3$ mmol por 12 horas contra $4,9 \pm 0,3$ mmol por 12

horas). Após a administração de endotoxina os indivíduos apresentaram sintomas de estado gripal (cefaléia, mialgia, náuseas e calafrios), que começaram entre 60 e 90 minutos após a injeção e tiveram pico máximo entre 90 e 120 minutos. Houve aumento nas concentrações circulantes de cortisol e catecolaminas e também, nos pacientes que receberam endotoxina, houve leucocitose, 240 minutos após a injeção. Houve significativa correlação entre a excreção de lactulose e produção de norepinefrina, entre a excreção de lactulose e a contagem mínima de leucócitos. Os autores sugerem que a exposição intestinal à endotoxina circulante aumenta a permeabilidade do intestino sadio e estas observações reforçam a hipótese de que pessoas enfermas em estados críticos, prolongadas e repetidas exposições à endotoxinas circulantes podem comprometer significativamente a integridade da barreira da mucosa intestinal.

3-Material e Método

3.1. Delineamento Experimental

Foram utilizados neste estudo 27 ratos albinos machos, (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, com peso médio de $279,4 \pm 40,56$ g. Os animais foram distribuídos em caixas com cinco ratos cada.

Estes ratos foram mantidos no Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná em condições ambientais constantes com ciclo dia/noite de 12 horas (8:00–20:00horas) controlado eletronicamente (Cronomat, Mallory do Brasil, São Paulo) e temperatura média de $22 \pm 1^{\circ}$ Celsius. Os ratos foram mantidos desta maneira por período mínimo de sete dias. Durante este período tiveram livre acesso à água e ração para ratos (NUVILAB-CR1, Nuvital, Curitiba). A oferta de água e ração aos animais foi suspensa apenas durante o tempo necessário para se completar o procedimento.

As normas técnicas adotadas neste estudo seguiram as orientações determinadas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas e as Normas para Apresentação de Trabalhos da Universidade Federal do Paraná. Foram adotados os princípios éticos para experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (1994).

Para a descrição anatômica dos ratos, observaram-se as orientações de WALKER & HOMBERGER (1997) E CHRISTENSON (1997).

3.2. Técnica Operatória

Os animais foram submetidos à indução anestésica com éter comercial e a seguir foram anestesiados com Hidrato de Cloral a 10% na dose de 500 mg/kg⁻¹ de peso corpóreo através da via intraperitoneal. Em seguida foram submetidos à tricotomia ampla do abdômen. Foram fixados em decúbito dorsal e utilizou-se polivinil-pirrolidona-iodo como antisséptico (figura 2). Colocaram-se campos de aplicação indireta esterilizados. Para a laparotomia procedeu-se a uma incisão mediana xifopúbica, com abertura de todos os planos da parede abdominal e exposição da cavidade. As alças intestinais foram afastadas para fora da cavidade peritoneal e protegidas com gaze estéril. Com o auxílio de tesoura dissecou-se o peritônio parietal posterior e o tecido adiposo que recobria os vasos sanguíneos abdominais. Separou-se a veia cava da aorta infra-renal (figura 3). Durante o período de clampeamento aórtico (figura 5), nos respectivos grupos, as alças intestinais foram recolocadas na cavidade abdominal e os bordos das feridas foram aproximados com 3 pontos de Vicryl[®] 000 (Johnson & Johnson) para evitar perda de líquido por evaporação. A hidratação dos animais foi mantida com SSI a 0,9% na dose de 3 ml/kg/hora por via subcutânea. A temperatura corporal dos animais foi mantida em 37°C com o auxílio de lâmpadas e aquecedores. Após a laparotomia os procedimentos variaram conforme o grupo a que pertencia cada rato, o que será descrito a seguir. O fechamento da ferida abdominal foi feito com sutura contínua em plano único com Vicryl[®] 000 (Johnson & Johnson) (figura 6), a seguir os animais foram mantidos em caixas individuais com água e ração.

FIGURA 2: ASPECTO ILUSTRATIVO DA EXPOSIÇÃO ANIMAL EM DECÚBITO DORSAL.



FIGURA 3: ASPECTO ILUSTRATIVO DA FERIDA OPERATÓRIA COM A EXPOSIÇÃO DOS VASOS SANGÜÍNEOS: ARTÉRIA AORTA INFRA-RENAL (A) E VEIA CAVA (V).



Os ratos foram divididos em 3 grupos, com 9 animais cada um, como se explicita em seguida:

3.2.1. Grupo Controle

Neste grupo, os ratos foram submetidos à laparotomia, dissecação da aorta infra-renal e manipulação desta durante o tempo necessário para simular a colocação do clampe aórtico (figura 3). Os animais permaneceram anestesiados por 2 horas. Durante este tempo os bordos da ferida cirúrgica foram aproximados com pontos de Vicryl® 000 (Johnson & Johnson). A seguir as alças foram retiradas novamente da cavidade abdominal para simular a retirada do clampe aórtico, recolocadas e a laparotomia foi fechada.

3.2.2. Grupo Isquemia

Neste grupo, os ratos foram submetidos à laparotomia, dissecação da aorta infra-renal. O clampeamento aórtico foi feito 5mm abaixo da veia renal esquerda (figura 5) e, para tanto, utilizou-se um microclampe (Vascu-Stat[®]) (figura 3). Alguns minutos após o clampeamento havia palidez dos membros posteriores dos animais e diminuição do calibre da aorta distal. Estes achados foram utilizados para monitorar a posição do clampe durante o período de isquemia. Os animais permaneceram anestesiados por 2 horas. Durante este tempo, as alças intestinais foram recolocadas na cavidade e os bordos da ferida cirúrgica foram aproximados com pontos de

Vicryl® 000 (Johnson & Johnson). Após este período, retiraram-se os clampes e a laparotomia foi fechada.

3.2.3. Grupo Isquemia e Reperusão

Neste grupo, os animais foram submetidos à laparotomia, dissecação da aorta infra-renal e colocação dos clampes 5mm abaixo da artéria renal esquerda. Os clampes foram deixados nesta posição por 2 horas. Durante este tempo os bordos da ferida cirúrgica foram aproximados com pontos de Vicryl® 000 (Johnson & Johnson). A seguir retiraram-se os clampes aórticos, fechou-se a laparotomia e esperou-se por mais 2 horas de reperusão sanguínea nos membros inferiores para coletar a segunda amostra sanguínea.

FIGURA 4: ASPECTO ILUSTRATIVO DOS CLAMPES UTILIZADOS NESTE ESTUDO.

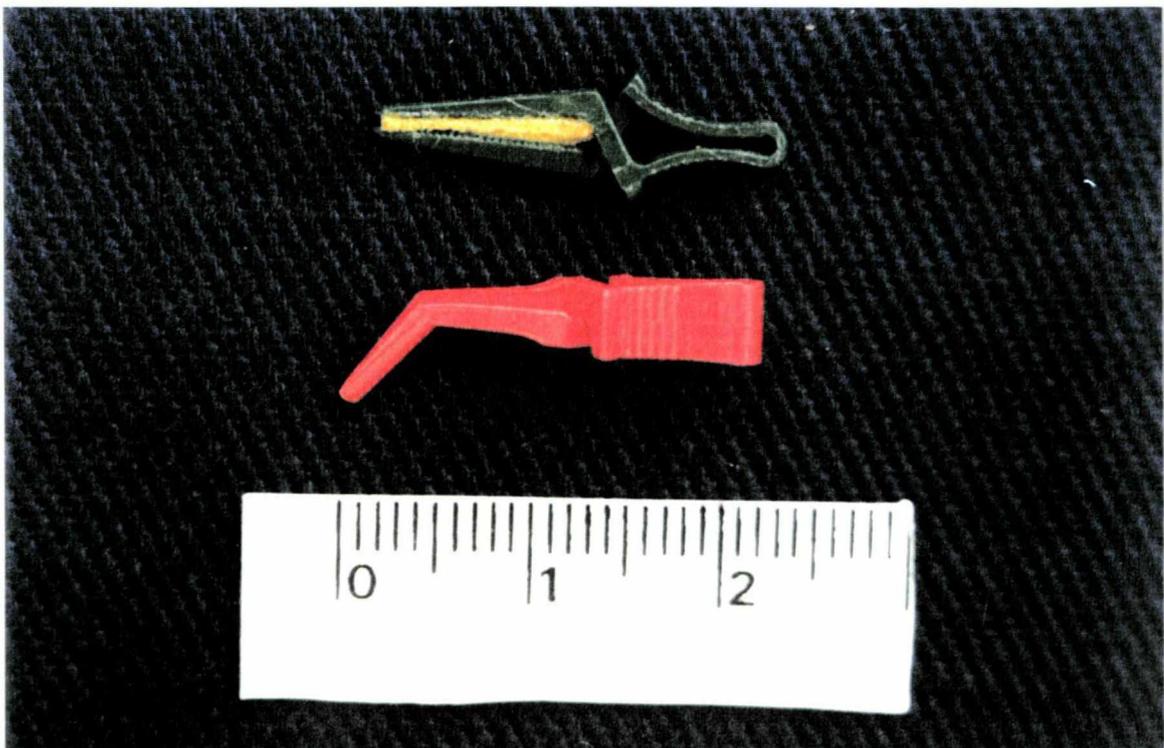
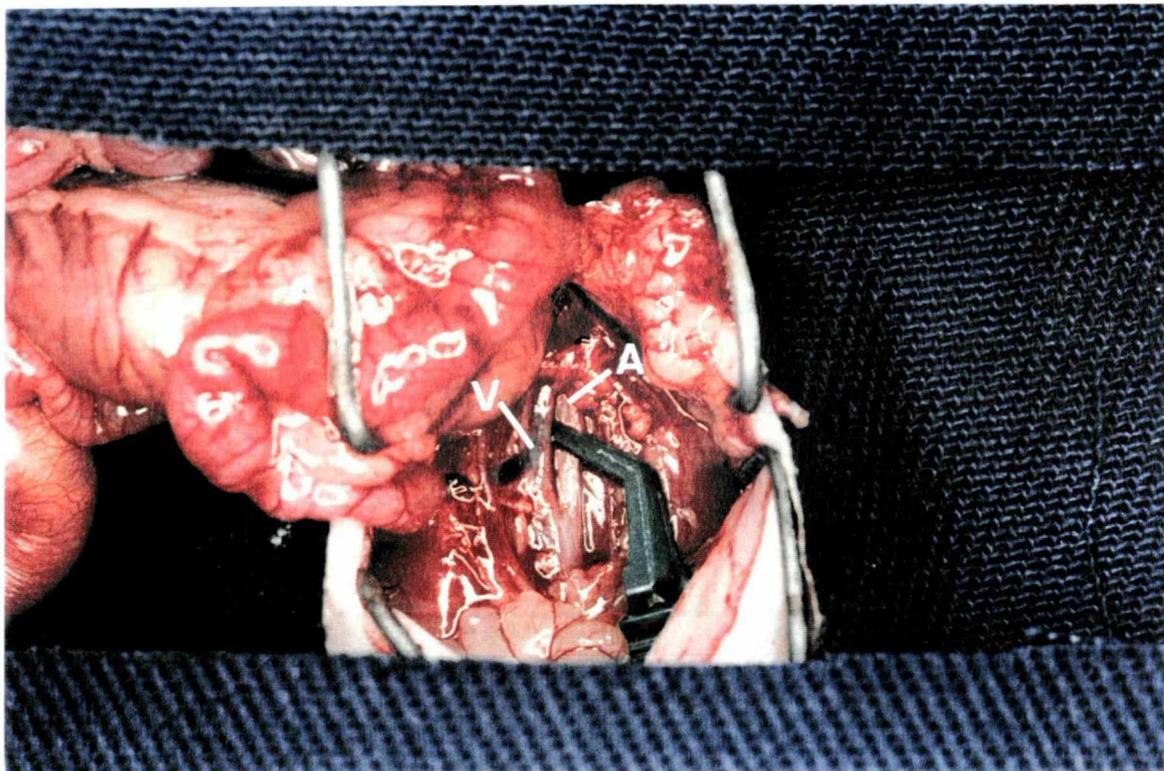


FIGURA 5: ASPECTO ILUSTRATIVO DO CLAMPEAMENTO DA ARTÉRIA AORTA (A) ABAIXO DAS ARTÉRIAS RENAIS.



NOTA: A= aorta infra-renal, e V= veia cava.

FIGURA 6: ASPECTO ILUSTRATIVO DA FERIDA OPERATÓRIA AO FINAL DO EXPERIMENTO.



3.3. Amostras

As amostras de sangue foram coletadas por punção intracardíaca direta no quinto espaço intercostal esquerdo. Utilizaram-se seringas e agulhas 25x6 (Becton & Dickinson do Brasil) apirogênicas heparinizadas com (Liquemine[®] 5000 U.I./ml Roche).

Coletaram-se 2 amostras com 0,5 ml de sangue total de cada animal. A primeira amostra foi coletada antes de iniciar o ato operatório e a segunda amostra foi coletada após o procedimento ter sido concluído, a saber:

T 0 ⇒ amostra coletada antes da laparotomia em todos os grupos.

T 2 horas⇒ amostra coletada após o experimento no grupo isquemia.

T 4 horas⇒ amostra coletada após o experimento nos grupos controle e grupo isquemia e reperfusão.

3.4. Dosagem de Endotoxina

As amostras foram imediatamente centrifugadas por 10 minutos a 5000 rpm em centrífuga refrigerada a 5°C (Bio Research[®]), em tubos de centrífuga despirogenizados (Falcon[®]). O plasma foi separado em duplicatas com pipetas despirogenizadas e armazenado a -20° C, em frascos de vidro também despirogenizados.

3.4.1. Princípio

Foi empregado o método do Lymulus Amebocyte Lisate (Endosafe® 1073) que tem por princípio a capacidade dos amebócitos extraídos do crustáceo *Limulus polyphemus* gelificarem-se na presença de endotoxinas (LPS). Esta gelificação é consequência da ativação da enzima zimogênica serin-protease em presença de cátions divalentes que produzem o coagulogênio do *Limulus* (BROGDEN & PHILLIPS, 1988).

3.4.2. Materiais

Os materiais utilizados foram: reagente LAL (Lisado de Amebócitos de *Limulus sp.*), endotoxina padrão de *Escherichia coli* (50 UE/ml), tubos de vidro despirogenizados para hemólise, frascos de 20ml despirogenizados, pipetas de vidro 2,0; 5,0 e 10 ml, agitador de tubos, banho-maria regulado a 37°C, pipetas automáticas com ponteiros apirogênicos (Gilson®).

3.4.3. Método

- **Preparação de materiais despirogenizados**

As pipetas e os frascos de vidro foram embalados com papel alumínio e colocados em forno Pasteur à temperatura de 180°C por 3 horas.

- **Preparação do reagente LAL**

Foi reconstituído o lisado com água apirogênica (água recém-destilada) no volume indicado pelo fabricante do reagente. Homogeneizou-se em agitador automático (Fanen®), evitando a formação de espuma. Este foi aliqotado com

pipeta automática: 0,1ml do reagente LAL em tubos de hemólise despirogenizados. Os tubos foram conservados em congelador a -20°C .

- **Preparação da endotoxina padrão**

O liofilizado de endotoxina padrão foi reconstituído com água e materiais despirogenizados, conforme as orientações do fabricante. A solução padrão de endotoxina continha 50 UE/ml.

- **Preparação da curva padrão de endotoxina**

Prepararam-se diluições do padrão de endotoxina conforme a tabela abaixo.

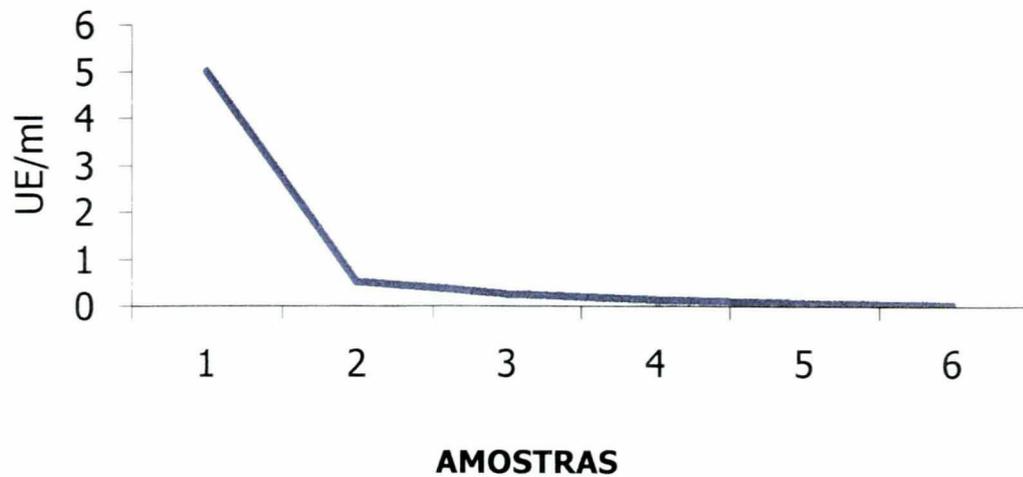
TABELA 1: DEMONSTRATIVO DAS DILUIÇÕES REALIZADAS A PARTIR DA SOLUÇÃO PADRÃO DE ENDOTOXINA.

Tubo	Volume a ser transferido (ml)	Volume de Água Apirogênica (ml)	Teste	Unidades Endotóxicas (UE/ml)
1	0,5ml de endotoxina padrão (25 UE/ml)	4,5ml	Positivo	2,5
2	0,5ml do tubo 1	0,5ml	Positivo	0,25
3	0,5ml do tubo 2	0,5ml	Positivo	0,025
4	0,5ml do tubo 3	0,5ml	Positivo	0,0125
5	0,5ml do tubo 4	0,5ml	Positivo	0,006
6	0,5ml do tubo 5	0,5ml	Negativo	0,003

FONTE: dados obtidos pelo autor.

NOTA: última titulação positiva foi 0,006 UE/ml.

GRÁFICO 1: DEMONSTRATIVO DA CURVA DE CALIBRAÇÃO PADRÃO DE ENDOTOXINA.



FONTE: dados obtidos pelo autor.

Cada diluição realizada foi agitada durante 5 minutos e, após, foi distribuído 0,1 ml de cada uma das diluições nos tubos com o reagente LAL. Incubou-se por 1 hora em banho-maria a 37°C. Após isso, os tubos não foram agitados. A leitura foi realizada com a inversão dos tubos a 180°C. O resultado positivo foi indicado pela formação de gel, que não se desprendia do fundo do tubo.

A sensibilidade do reagente LAL foi acertada como a última diluição com reação de gelificação positiva.

3.4.4. Análise Qualitativa de Endotoxina nas Amostras de Plasma de Ratos

Distribuiu-se 0,1ml da amostra em tubo que continha o reagente LAL. Realizou-se a prova com controle positivo (endotoxina padrão 5 UE/ml) e controle negativo (água apirogênica). Foi incubado a 37°C por 1 hora e a seguir a leitura. Se a amostra produzisse reação de gelificação, procedia-se à análise quantitativa, conforme descrito abaixo.

Testaram-se dez seringas, agulhas, amostras de heparina, frascos de armazenamento do plasma e os tubos, onde foram realizados os testes para verificar a ausência de substâncias pirogênicas.

3.4.5. Análise Quantitativa de Endotoxina nas Amostras de Plasma de Ratos

Realizaram-se diluições seriadas com fator 2 de diluição 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16.

Foi distribuído 0,1ml de cada diluição em tubos, que continham 0,1 ml do reagente LAL. Incubou-se a 37°C por 1 hora e realizou-se a leitura.

Se houvesse gelificação, procedia-se ao cálculo do teor de endotoxina em Unidades Endotóxicas por ml, multiplicando a sensibilidade do reagente LAL pela última diluição que produziu reação de gelificação.

3.5. Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de ANOVA e a seguir pelo teste de Student-Newman-Keuls, que é um teste de comparações múltiplas (SIEGEL, 1981).

O nível de significância "p" considerado foi de 5%.

4-Resultados

Durante a realização deste estudo experimental não ocorreram óbitos de animais.

Os pesos corporais médios dos animais em cada grupo foram similares (tabela 2, tabela 4 em anexo). Estes valores, quando comparados, não mostraram diferenças estatisticamente significativas.

TABELA-2: PESO CORPORAL MÉDIO EM GRAMAS DOS RATOS.

Grupo	Média \pm DP
Controle	283,22 \pm 34,2g
Isquemia	260,82 \pm 36,55g
Isquemia e Reperusão	294,39 \pm 46,644g

4.1 Dosagens de Endotoxinas

Não foram detectadas endotoxinas circulantes no sangue dos animais dos grupos controle e isquemia pelo método do LAL.

Os animais do grupo isquemia e reperusão apresentaram endotoxinas na circulação sistêmica com valores estatisticamente significativos ($p < 0,001$), quando comparados com os grupos controle e isquemia (tabela 3, gráfico 2 e 3).

TABELA-3: DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS PADRÕES DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINAS CIRCULANTES (UE/ml) NOS GRUPOS CONTROLE, ISQUEMIA E ISQUEMIA/REPERFUSÃO.

Grupos	Média \pm DP
Controle	0 UE/ml
Isquemia	0 UE/ml
Isquemia e Reperfusão	0,034 \pm 0,0174 UE/ml

GRÁFICO-2: DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINAS NOS GRUPOS ESTUDADOS.

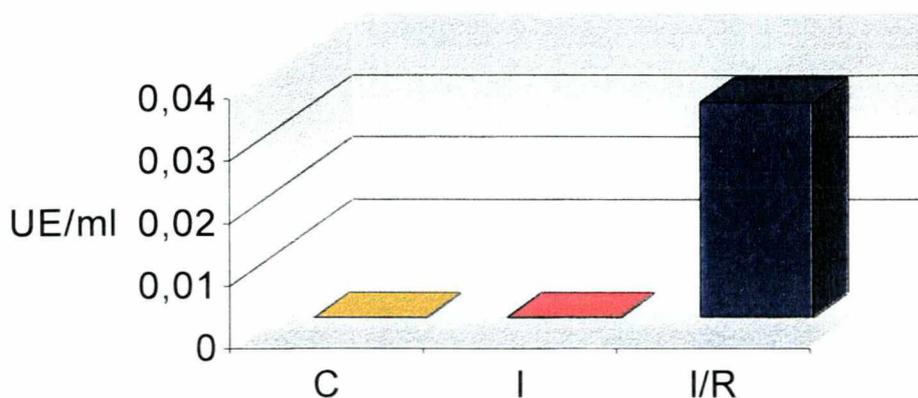
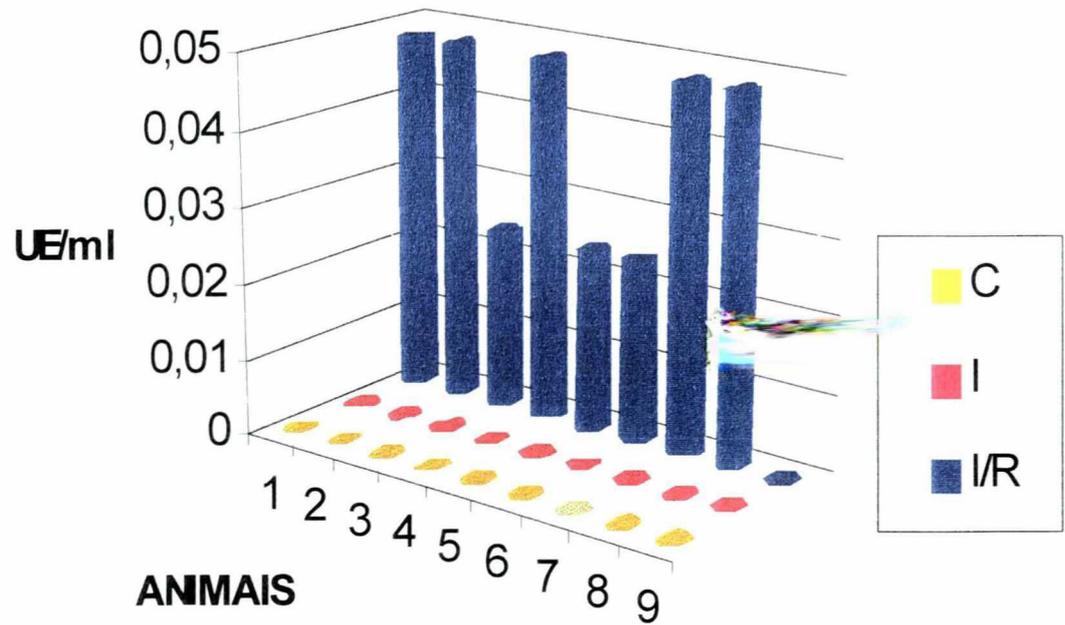


GRÁFICO-3: DEMONSTRATIVO DOS VALORES DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINAS DOS ANIMAIS.





5-Discussão

Quando ocorre isquemia aguda em um tecido, o suprimento sangüíneo arterial está totalmente bloqueado. Este fato acontece em cirurgias arteriais, transplantes de órgãos e até em cirurgias ortopédicas, onde é feito garroteamento temporário com o intuito de obter campo operatório exangue.

A mortalidade relacionada a cirurgias vasculares de grande porte ainda é problema que preocupa os cirurgiões vasculares em todo o mundo. A cirurgia de correção de aneurisma de aorta abdominal cursa com mortalidade em torno de 1% a 10% nos melhores centros mundiais (OLSEN et al., 1991; ROUMEN et al., 1993; KATZ, STANLEY, ZELENOCK, 1994). Quando o aneurisma se rompe, a mortalidade esperada, mesmo que o paciente seja atendido e operado, é de mais de 50%.

As cirurgia de embolectomias em artérias periféricas também podem ter evolução não favorável; a mortalidade relacionada com este tipo de cirurgia pode chegar a mais de 10% (YASSIN et al., 1996).

Grande parte dos pacientes irão a óbito por complicações que não são relacionadas diretamente com a técnica cirúrgica. As principais causas de óbito nesses pacientes, no período de pós-operatório imediato, são: disfunções respiratórias, renais, falências hepáticas e até o cenário sombrio da Síndrome da Falência de Múltiplos Órgãos (ERTEL et al., 1994; HARRIS et al., 1991; OLSEN et al., 1991). Esta síndrome é encontrada em 20% de todos os pacientes que morrem após cirurgias cardiovasculares (YASSIN et al., 1996).

Quando se instala a síndrome da falência de múltiplos órgãos, em 24% dos pacientes não há evidência de infecção (MENGER et al., 1992). Infecção bacteriana ou sépsis é detectada em grande parte dos pacientes, com a síndrome instalada, após dois ou mais dias. Este fato motivou vários estudos que consideraram o intestino como a fonte de endotoxinas e bactérias para a corrente circulatória (ALEXANDER et al., 1990; ALEXANDER et al., 1991; CARRICO, 1993; CARRICO et al., 1986; CARTER et al., 1990; DEITCH et al., 1993; DEITCH et al., 1989 B; ERTEL, FRIEDL, TRENTZ, 1994; GORIS, BOEKHOLTZ, van BEBBER, 1986; NAVARATNAM et al., 1990; RUSH, SORI, MURPHY, 1988; SAADIA, 1995; SWANK & DEITCH, 1996; van GOOR et al., 1994; MOORE et al., 1994).

O aparelho digestório possui em seu interior bactérias e seus metabólitos, as toxinas, que devem ser bloqueadas de forma seletiva concomitantemente à absorção de nutrientes. Para realizar esta função, o intestino mobiliza métodos imunológicos e não imunológicos, com a função de prevenir a passagem de bactérias e endotoxinas para fora da luz intestinal. Esse mecanismo é denominado, genericamente, de barreira intestinal (REYNOLDS, 1996; TRAYA, 1999). Quando esta barreira é quebrada, entra em jogo a segunda linha de defesa, formada por este elenco: tecido linfóide intestinal, células Kupffer hepáticas e imunoglobulinas séricas (YASSIN, 1998). Essas células e tecidos com função imunológica ativam a produção de citocinas pró-inflamatórias ($TNF\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-8$) e outros mediadores imunoinflamatórios. Esses mediadores intestinais podem induzir a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica e esta levar à Síndrome da Falência de Múltiplos Órgãos.

Diversas condições que geram resposta inflamatória severa ou que associe problemas imunológicos com regimes terapêuticos que alterem o balanço ecológico da microflora nativa intestinal, tais como: queimaduras (ALEXANDER et al., 1991; CARTER et al., 1990; LeVOYER et al., 1992; DEITCH et al., 1985), traumas mecânicos (BAKER et al. 1998; PAPE et al., 1994; ROUMEN et al., 1993; RUSH et al., 1988), infecções (TRAYA, 1999), choque (RUSH et al., 1988), isquemia intestinal (MARTINS, 1997), uso de vasodilatadores (TRAYA, 1999), quimioterapias (BERG, 1992), desnutrição (ALEXANDER et al., 1990), nutrição parenteral total (MOORE et al., 1989) e outros, são capazes de levar à falência da barreira intestinal com translocação de bactérias e endotoxinas para fora da luz intestinal.

Neste estudo verificamos que além destas condições, a isquemia e reperfusão de órgãos distantes ao trato digestório, podem levar à perda da barreira intestinal com detecção de endotoxinas na corrente circulatória de ratos.

A endotoxemia é induzida pela disseminação de componentes lipopolissacarídeos do revestimento de bactérias Gram-negativas. Desta forma, o termo LPS passou a ser de uso corrente e sinônimo de endotoxina (ERTEL et al., 1994).

A saída de LPS para fora da luz intestinal, gerando a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica, podendo levar até a Síndrome da Falência de Múltiplos Órgãos, levou alguns autores a determinar o trato digestório como o causador desta síndrome. BORDER et al. (1987) criaram o termo "estado séptico intestinal" e MARSHALL et al. (1993) definiram o intestino como "abscesso não

drenado” na Síndrome de Disfunção de Múltiplos Órgãos. CARRICO et al. (1986) definiram o intestino como o “motor” dessa disfunção, porém SWANK & DEITCH (1996) concluíram que o sistema imunoinflamatório é o verdadeiro “motor” dessa síndrome, enquanto o intestino é um dos principais “pistões” que impulsionam esse “motor”.

Há múltiplas vias por onde as bactérias podem translocar do aparelho digestório para sítios sistêmicos: migração retrógrada pulmonar, migração direta através da parede intestinal e migração para linfonodo mesentérico ou fígado através dos canais linfáticos ou vasculares; uma ou mais destas vias podem ocorrer simultaneamente (MARCHALL et al., 1993).

Sabe-se que a permeabilidade intestinal às macromoléculas é alterada na isquemia seguida de reperfusão de membros de ratos e camundongos (CORSON et al., 1992; YASSIN et al., 1997; GRANGER, 1988).

No presente estudo realizou-se isquemia dos membros caudais de ratos mediante o clampeamento da aorta infra-renal para avaliar a liberação de endotoxinas para a circulação sistêmica.

Na literatura não se encontraram trabalhos que utilizem esta técnica para induzir endotoxemia; alguns trabalhos semelhantes foram realizados, sempre utilizando o método do torniquete de ROSENTHAL (1943). CARTER et al. (1998) utilizaram o clampeamento da aorta abdominal de ratos com o intuito de estudar a histopatologia muscular dos membros caudais após isquemia e reperfusão.

O método do torniquete, garroteamento por elásticos, possui desvantagens ao simular o que ocorre normalmente em cirurgias vasculares, porque fecha, além da circulação arterial, a circulação venosa impedindo o retorno venoso. Sabe-se que é difícil e impreciso ter a medição da força exercida por um elástico, porque sua tensão de estiramento não é linear. Então, não se consegue, com precisão medir a força deste sobre as diferentes circunferências dos membros dos animais e, assim, torna-se difícil conseguir uniformidade da ação do torniquete entre os grupos estudados. Além disso, a ação direta do elástico, pode lesar a musculatura, se a compressão for muito alta e, se muito fraca, poderá não agir adequadamente, não impedindo o suprimento arterial do membro.

Com o modelo experimental utilizado nesta dissertação, conseguiu-se simular o clampeamento aórtico realizado em humanos em algumas cirurgias arteriais. Este modelo mostrou-se seguro, porque por visão direta se verificava a oclusão do vaso sangüíneo durante o período de isquemia. O inconveniente desta técnica é que, durante o período de ação do clampe, o animal deve permanecer imóvel, anestesiado, para evitar que ele se desloque do vaso sangüíneo. A anestesia prolongada poderá ser evitada, futuramente em outros trabalhos, com o aprimoramento da técnica e com a utilização de clampes menores mais compatíveis com o calibre dos vasos abdominais dos animais.

Adotaram-se duas horas de isquemia seguidas de duas horas de reperfusão, no grupo desafio deste estudo, porque se verificou na literatura que estes períodos seriam os necessários para testar-se o modelo de clampeamento

aórtico e se haveria detecção de endotoxinas na corrente circulatória. CORSON et al.(1992) e YASSIN et al. (1998) obtiveram resultados semelhantes, utilizando o método do torniquete nos membros caudais dos animais, com três horas de isquemia seguidas de 2 horas de reperfusão. STROCK et al. (1969 A) verificaram que as primeiras lesões irreversíveis no tecido muscular com o uso do torniquete em membros de ratos se iniciavam em 30 minutos e atingiam o máximo em 60 minutos. Os mesmos autores também verificaram que a heparinização sistêmica dos animais não alterava o fenômeno do "não refluxo", que é o fato de algumas áreas teciduais não reperfundirem de imediato após a liberação dos torniquetes.

Os dados obtidos neste estudo denotam que só a isquemia não induz níveis detectáveis de endotoxinas na corrente circulatória; este evento, seguido de reperfusão, promove o aparecimento de endotoxinas intestinais detectáveis na corrente circulatória. O exato mecanismo como esta ocorrência afeta a permeabilidade intestinal ainda não está totalmente entendido (CORSON et al., 1992; YASSIN et al., 1996). Sabe-se que a reperfusão de órgãos isquêmicos têm efeitos sistêmicos danosos porque "lava" os metabólitos formados localmente nos tecidos e esses irão agir sistematicamente até serem metabolizados.

CORSON et al. (1992) verificaram que a permeabilidade intestinal às endotoxinas é alterada após a aplicação e soltura dos torniquetes nos membros dos animais. As concentrações sistêmicas de endotoxinas elevaram-se significativamente em relação ao grupo controle. A permeabilidade intestinal destes animais foi afetada por lesões comprovadas por microscopia eletrônica: danos na mucosa, encurtamento

das microvilosidades e rupturas nas junções intercelulares em todos os animais do grupo isquemia e reperfusão foram detectadas. Estes autores também verificaram que a hipotensão que ocorre no período de reperfusão, por si só, não altera a permeabilidade intestinal.

YASSIN et al. (1997) verificaram que a reperfusão de membros caudais de ratos diminuiu a espessura da mucosa do intestino delgado dos animais e aumentou a permeabilidade de todo o intestino.

WELCH et al.(1998) estudaram pacientes que foram submetidos à cirurgias eletivas na aorta abdominal, aneurismectomia ou ponte arterial, com colonoscopia e biópsias intestinais. Os resultados mostraram que ocorreu lesão da mucosa intestinal, identificada pela biópsia, em 30% dos pacientes.

PATERSON et al. (1989) verificaram que a reperfusão, comum em cirurgias vasculares após o desclampamento de grandes vasos, estimula a síntese de tromboxano A₂. O tromboxano formado poderá levar ao aumento da pressão arterial pulmonar média, seqüestro de PMN nos tecidos pulmonares e aumentar a permeabilidade microvascular pulmonar. Estes fatores podem levar ao edema intersticial pulmonar e até à síndrome da angústia respiratória do adulto.

ROUMEN et al. (1993) estudaram a permeabilidade intestinal após isquemia e reperfusão em pacientes submetidos a cirurgias de grande porte. Os autores utilizaram o teste da lactulose e manitol. Este é fundamentado na diferença de vias de absorção que o intestino utiliza. O manitol tem peso molecular menor em relação à lactulose e por isso é absorvido por poros aquíferos que existem na

membrana celular do enterócito. A lactulose, molécula maior, é absorvida através das junções intercelulares e zonas de extrusão dos vilos intestinais. A excreção de lactulose e manitol foi significativamente maior no grupo que foi submetido a cirurgias eletivas e emergenciais em comparação do grupo controle, que não foi operado. Este estudo demonstrou que, após cirurgias vasculares de grande porte, a permeabilidade intestinal está elevada.

PAPE et al. (1994) verificaram que a permeabilidade intestinal pode ser afetada pelas moléculas de xantina-oxidase produzidas durante a reperfusão de órgãos distantes ao intestino.

O tecido isquêmico produz ATP sem a presença de oxigênio; então, mobiliza o metabolismo anaeróbico para produzir energia e ácido láctico. A acidose local contribui para alterar o trabalho das enzimas celulares que cada vez mais irão produzir menos energia. LEMASTERS et al. (1997) verificaram em tecidos cardíacos e hepáticos que o pH tecidual abaixo de sete protege as reações celulares mitocondriais e quando há presença de cálcio iônico (Ca^{+2}), pH acima de sete e radicais livres há abertura de poros de transição na membrana mitocondrial com conseqüente edema mitocondrial. O edema mitocondrial interrompe a formação de ATP; por isso, paradoxalmente, as lesões nestes tecidos são agravadas no período de reperfusão.

Quando os níveis de ATP celulares estão exauridos, não há como manter as funções homeostáticas das membranas celulares. O gradiente sódio/potássio da membrana não é mantido. Posteriormente há a autólise celular. A reperfusão

sangüínea traz energia e oxigênio para o tecido restabelecer sua homeostasia, mas poderá ter repercussões indesejáveis locais e sistêmicas. Acidose metabólica, hipercalemia, mioglobinemia, mioglobinúria e falência renal, edema intersticial pulmonar são exemplos de complicações sistêmicas relacionadas à reperfusão tecidual. O edema intersticial pulmonar é causado pela ativação de PMN durante a isquemia (GRACE, 1994). O seqüestro dos PMN ativados nos tecidos pulmonares, renais e hepáticos é importante impulso para gerar Síndrome da Falência de Múltiplos Órgãos (DEITCH et al., 1990).

Os efeitos locais da reperfusão podem ampliar as lesões celulares isquêmicas e levar os tecidos a produzir outros metabólitos, que serão lançados na circulação sistêmica, como é o caso dos radicais livres de oxigênio que são produzidos localmente pela enzima xantina-oxidase (tecidos epiteliais) e NADPH-oxidase (PMN). O sangue que está reperfundindo os tecidos tem íons de cálcio que ativam enzimas teciduais (proteases e fosfolipases), com produção de mediadores pró-inflamatórios como FAP e compostos eicosanóides (tromboxanos, leucotrienos e prostaglandinas). O FAP e o leucotrieno B4 podem secundariamente amplificar o processo inflamatório e gerar a formação de citocinas que ativam os PMN com lesão endotelial da microcirculação.

Os radicais livres produzidos durante o período de reperfusão são os principais responsáveis pelas lesões em órgãos distantes daqueles que sofreram a isquemia. O aparelho digestório dos mamíferos possui alta concentração de xantina-oxidase; especialmente essa concentração é maior na mucosa do intestino delgado.

Quando há a reperfusão, a produção de radicais livres por estas enzimas nestes locais é muito elevada (ZIMMERMAN & GRANGER, 1992). Isto poderia explicar o aumento da permeabilidade intestinal, quando há reperfusão.

Alguns fatores locais podem dificultar a reperfusão de tecidos isquêmicos e agravar os danos locais e sistêmicos aos tecidos. STROCK et al. (1969) verificaram que em algumas áreas dos tecidos ocorre o fenômeno chamado "não refluxo". Este deve-se a obstruções que poderão ocorrer na microcirculação, durante o período de isquemia e impedir que sangue, rico em nutrientes, chegue aos tecidos, mantendo e perpetuando os efeitos danosos da isquemia. Agentes fibrinolíticos, substâncias hiperosmolares (como o manitol) (SCHLAG et al., 1999) e até mesmo fasciotomias podem minimizar este processo (GRACE, 1994).

Os efeitos da reperfusão e translocação bacteriana podem ser amenizados por algumas drogas; alguns exemplos são: o alopurinol, que é inibidor competitivo da xantina-oxidase e pode reduzir a endotoxemia por reduzir a peroxidação lipídica da mucosa intestinal (ZIMMERMAN & GRANGER, 1992; MENDER et al., 1992; GRACE, 1994); a pentoxifilina é uma metilxantina com propriedades de inibir o fator agregador de plaquetas (FAP) e aumentar a síntese de prostaciclina (vasodilatador) (ADAMS et al., 1995); a dexametasona e L-NAME (KNIGHT et al., 1997); a superóxido-dismutase, que é enzima carreadora dos radicais livres superóxido (O_2^-) (YOUNES et al., 1987; MENDER et al., 1992) e outras.

Melhoramentos futuros virão com o entendimento da endotoxemia e sua base imunológica. Anticorpos monoclonais antiendotoxinas estão sendo estudados

(CORSON et al., 1992; MYTHEN et al., 1993); mudanças nas técnicas cirúrgicas poderão reduzir o tempo de isquemia e novos meios farmacológicos poderão ser descobertos com o intuito de bloquear: a ativação sistêmica de PMN, o dano direto do miócito, a liberação de leucotrienos e de radicais livres de oxigênio. O modelo experimental de endotoxemia que obtivemos nesta dissertação poderá ser útil para estes estudos.

6-Conclusão

Após a análise dos resultados do presente estudo, pode-se concluir o que segue:

1. O modelo animal experimental desenvolvido nesta tese é reproduzível.
 2. A isquemia aguda de membros caudais de ratos, por si só, não induziu níveis detectáveis de endotoxemia pelo método do LAL.
 3. A isquemia aguda, seguida de reperfusão de membros caudais, em ratos, induziu níveis detectáveis de endotoxemia pelo método do LAL.
-

TABELA 4: PESO DE TODOS OS ANIMAIS ESTUDADOS.

Grupos	Rato	Peso em gramas
Controle	1	305
	2	298,48
	3	335,2
	4	314,06
	5	243,95
	6	265,22
	7	239,62
	8	297,32
	9	250,1
Isquemia	10	252,7
	11	222,4
	12	253,3
	13	345,16
	14	255,4
	15	235,7
	16	270,5
	17	280,4
	18	231,8
Isquemia e Reperusão	19	237,7
	20	232
	21	325
	22	318,4
	23	298,4
	24	265,65
	25	298
	26	383,38
	27	291

TABELA 5: DEMONSTRATIVO DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINAS SÉRICAS EM TODOS OS ANIMAIS.

Grupo	Rato	Dosagem Inicial (T0)	Dosagem Final
Controle	1	não detectado	não detectado
	2	não detectado	não detectado
	3	não detectado	não detectado
	4	não detectado	não detectado
	5	não detectado	não detectado
	6	não detectado	não detectado
	7	não detectado	não detectado
	8	não detectado	não detectado
	9	não detectado	não detectado
Isquemia	10	não detectado	não detectado
	11	não detectado	não detectado
	12	não detectado	não detectado
	13	não detectado	não detectado
	14	não detectado	não detectado
	15	não detectado	não detectado
	16	não detectado	não detectado
	17	não detectado	não detectado
	18	não detectado	não detectado
Isquemia e Reperusão	19	não detectado	0,048 UE/ml
	20	não detectado	0,048 UE/ml
	21	não detectado	0,024 UE/ml
	22	não detectado	0,048 UE/ml
	23	não detectado	0,024 UE/ml
	24	não detectado	0,024 UE/ml
	25	não detectado	0,048 UE/ml
	26	não detectado	0,048 UE/ml
	27	não detectado	não detectado

Referências Bibliográficas

- ADAMS Jr., J.G.; DHAR, A.; SHUKLA, A. D.; et al. Effect of pentoxifylline on tissue injury and platelet- activating factor production during ischemia-reperfusion injury. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v.21, n.5, May 1995.
- ALEXANDER, J.W.; BOYCE, S.T.; BABCOCK, G.F. The process of microbial translocation. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 212, n.4, p.496-512, Oct. 1990.
- ALEXANDER, J.W.; GIANOTTI, L.; PYLES, T. et al. Distribution and Survival of *Escherichia coli* translocating from the intestine after thermal injury. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v.213, n.6, p.558- 567, June 1991.
- APPELL, H.J.; DUARTE, J.A.; GLÖSER , S.; et al. Prevention of postischemic oxidative stress can reduce muscle edema after administration of tourniquet. **Arch. Orthop. Trauma Surg.**, Berlin, v. 116, p. 101-105, 1997.
- BAKER, J.W.; DEITCH, E.A.; LI, M.; et al. Hemorrhagic shock induces bacterial translocation from the gut. **J. Trauma**, Baltimore, v.28, n. 7, p.896-906, July 1998.
- BARRY, M.C.; KELLY, C.J.; ABDIH, H.; WATSON, R.W.G.; et al. Differential effects of lower limb revascularisation on organ injury and the role of the amino acid taurine. **Eur. J. Endovasc. Surg.**, London, v.13, p. 193-201, 1997(A).
- BARRY, M.C.; KELLY, C.; BURKE, P.; SHEEHAN, S.; REDMOND, H.P.; BOUCHIER-HAYES, D. Immunological and physiological responses to aortic surgery: effect of reperfusion on neutrophil and monocyte activation and pulmonary function. **Br. J. Surg.**, Guildford, v.84, n.4, p. 513-519, Apr. 1997(B).
- BERG, R.D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **J. Med.**, Westbury, v. 23 , p. 217-44, 1992.
- BORDER, J. R.; HASSET, J.; LaDUCCA, J.; et al. The gut origin septic states in blunt multiple trauma in the ICU. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 206, n.4, p. 427- 448. Oct. 1987.
- BRATHWAITE, B.D.; PETRIK, P.V.; MOORE, W.S.; et al. Aspirin increases tissue oedema after skeletal muscle ischaemia and reperfusion. **Eur. J. Endovasc. Surg.**, London, v.12, p. 76- 80. 1996.
- BROGDEN, K. A.; PHILLIPS, M. The ultrastructural morphology of endotoxins and lipopolysaccharides. **Electron. Microsc. Ver.**, Guildford, v.1, n.2, p. 261-278. 1988.
- CARRICO, C.J. The elusive pathophysiology of the multiple organ failure syndrome. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v.218, n.2, p.109-110. Aug. 1993.

- CARRICO, C.J.; MEAKINS, J.L.; MARRSCHALL, J.C. et al. Multiple-organ-failure syndrome. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 121, p.196-208, Feb. 1986.
- CARTER, W.O.; BULL, E.; BORTOLON, L. A murine skeletal muscle ischemia-reperfusion injury model: differential pathology in BALB/c and DBA/2N mice. **J. Appl. Physiol.**, Bethesda, v. 85, n. 5, p. 1676-1683, 1998.
- CARTER, E.A.; TOMPKINS, R.G.; SCHIFFRIN, E.; BURKE, J.F. Cutaneous thermal injury alters macromolecular permeability of rat small intestine. **Surgery**, St. Louis, v.107, n.3, p.335- 341, Mar. 1990.
- CHRISTENSON, D.E. **Veterinary medical terminology**. New York: W.B. Saunders, 1997.
- CORSON, R.J.; PATERSON, I.S.; O'DWYER, S.T.; et al. Lower limb ischaemia and reperfusion alters gut permeability. **Eur. J. Vasc. Surg.**, London, v.6, n.2, p.158-163. Mar. 1992.
- DEITCH, E.A. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. **Arch. Surg.**, Chicago, v.125, p.403- 404, Mar. 1990.
- DEITCH, E.A.; BERG, R.; SPECIAN, R. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. **Arch. Surg.**, Chicago, v.122, p.185- 190. Feb. 1987.
- DEITCH, E.A.; KEMPER, A.C.; SPECIAN, R.D.; BERG, R.D. A study of the relationship among survival, gut-origin sepsis, and bacterial translocation in a model of systemic inflammation. **Circ. Shock.**, Philadelphia, v.40, n.2, p.99-104. 1993.
- DEITCH, E.A.; MAEJIMA, K.; BERG, R. Effect of oral antibiotics and bacterial overgrowth on the translocation of the gastrointestinal tract microflora in burned rats. **J. Trauma**, Baltimore, v.25, n.5, p.385-391, May 1985.
- DEITCH, E.A.; MA, L.; MA W.J.; CRISHAM, M.B.; et al. Inhibition of endotoxin-induced bacterial translocation in mice. **J. Clin. Invest.**, New York, v.84, n.1, p.36-42, July 1989.
- DEITCH, E.A.; TAYLOR, M.; GRISHAM, M. et al. Endotoxin induces bacterial translocation and increases xanthine oxidase activity. **J. Trauma**, Baltimore, v.29, n.12, p.1679- 1683, Dec. 1989.
- ERTEL, W.; FRIEDL, H.P.; TRENTZ, O. Multiple organ dysfunction syndrome (MODS) following multiple trauma: rationale and concept of therapeutic approach. **Eur. J. Pediatr. Surg.**, Stuttgart, v. 4, p. 243- 248, 1994.

- GORIS, R.J.A.; BOEKHOLTZ, W.K.F.; vanBEBBER, I.P.T. Multiple-organ failure and sepsis without bacteria: an experimental model. **Arch. Surg.**, Chicago, v.121, p. 897- 901, Aug. 1986.
- GRACE , P.A. Ischemia-reperfusion injury. Review. **Br. J. Surg.**, Guildford, v. 81, p. 637-647, 1994.
- GRANGER, D.N. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.255, n.6, p.1269-1275, 1988.
- HAFEZ, H.M.; BERWANGER, C.S.; LINTOTT, P.; DELIS, K.; et al. Endotoxemia during supraceliac aortic crossclamping is associated with suppression of the monocyte CD 14 mechanism: possible role transforming growth factor- B₁. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v.31, n. 3, Mar. 2000.
- HARRIS, L.M.; FAGGIOLI, G.L.; FIEDLER, R.; CURL, G.R.; RICOTTA, J.L. Ruptured abdominal aortic aneurysm: factors affecting mortality rates. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v. 14, p.812–820, 1991.
- HEEL, K.; BLENNERHASSETT, L.; KONG, S.E.; et al. Influence of ischaemia – reperfusion injury on CD44 expression in rat small intestine. **Br. J. Surg.**, Guildford, v. 85, p. 1086- 1089, 1998.
- HERNANDEZ, L.A.; GRISHAM, M.B.; TWOHIG, B.; et al. Role of neutrophils in ischemia-reperfusion induced microvascular injury. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.253, n.3, p.699-703. 1987.
- KATZ, D.J.; STANLEY, J.C.; ZELENOCK, G.B. Operative mortality rates for intact and ruptured abdominal aortic aneurysm in Michigan: an eleven-year statewide experience. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v.19, n.5. May 1994.
- KERRIGAN, C.L.; STOTLAND, M.A. Ischaemia reperfusion injury: a review. **Microsurgery**, New York, v.14, p.165- 175. 1993.
- KOIKE, K.; MOORE, E.E.; MOORE, F.A. et a. Gut ischaemia-reperfusion produces lung injury independent of endotoxin. **Crit. Care Med.**, Baltimore, v.22, n.9, p.1438- 1444. Sept. 1994.
- KNIGHT, K.R.; ZHANG, B.; MORRISON, W.A.; STEWART, A.G. Ischaemia–reperfusion injury in mouse skeletal muscle is reduced by N- nitro- L- arginina metil ester and dexametasona. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v. 332, p.273- 278. 1997.
- LEMASTERS, J.J.; NIEMINEM, A. L.; QIAN, T. The mitochondrial permeability transition in toxic, hipoxic and reperfusion injury. **Mol. Cell. Biochem.**, Netherlands, v.174, n.1-2, p. 159- 165, Sept. 1997.

- LeVOYER, T.; CIOFFI, W.G.; PRATT, L. et al. Alterations in intestinal permeability after thermal injury. **Arch. Surg.**, Chicago, v.127, p.26-30, Jan. 1992.
- LINDSAY, T.F.; LUO, X.P. ; LEHOTAY, D.C.; et al. Ruptured abdominal aortic aneurysm, a "two-hit" ischemia / reperfusion injury and evidence from an analysis of oxidative products. **J. Vasc. Surg.** , St. Louis, v. 30, n.2 , Aug. 1999.
- MARSCHALL, J.C.; CHRISTOU, N.V.; MEAKINS, J.L. et al. The gastrointestinal tract: the "undrained abscess" of multiple organ failure. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v.218, n.2, p.111-119, Aug. 1993.
- MARTINS, E.L. **Efeito do tempo da isquemia sobre a translocação bacteriana em ratos com isquemia segmentar do cólon descendente.** Curitiba, 1997. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica)-Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- MATHIESON, M.A.; DUNHAM, B.; HUVAL, W. V.; et al. Ichaemia of the limb stimulates thromboxane production and myocardial depression. **Surg. Obstet. Gynecol.**, Chicago, v.157, p.500-504, Dec. 1983.
- MENGER, M.D.; PELIKAN, S.; STEINER, D.; MESSMER, K. Microvascular ischaemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.263, n.6, p.1901-1906, Dec. 1992.
- MICHAL, G. **Biochemical pathways: an atlas of biochemistry and molecular biology.** Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, Germany 1999.
- MOORE, E.E.; MOORE, F.A.; FRANCIOSE, R.J. et al. The postischemic gut serves as a priming bed for circulating neutrophils that provoke multiple organ failure. **J. Trauma**, Baltimore, v.37, n.6, p.881-887, Dec. 1994.
- MOORE, F.A.; MOORE, E.E.; JONES, T.N. et al. Enteral feeding versus parenteral following major abdominal trauma reduced septic morbidity. **J. Trauma**, Baltimore, v.29, n.7., p.916-922, July 1989.
- MYTHEN, M.G.; BARCLAY, G.R.; PURDY, G.; HAMILTON-DAVIES, C.; et al. The role of endotoxin immunity neutrophil degranulation and contact activation in the pathogenesis of post-operative organ dysfunction. **Blood Coagul. Fibrinolysis**, Oxford, v.4, p. 999-1005, 1993.
- NAVARATNAM, R.L.N.; MOORIS, S.E.; TRABER, D.L. FLYNN, J. et al. Endotoxin increases mesenteric vascular resistance and bacterial translocation. **J. Trauma**, Baltimore, v.30, n.9, p.1104-1115, Sept.1990.

- O'DWYER, S.; MICHIE, H.R.; ZIEGLER, T.R. A single dose of endotoxin increases intestinal permeability in healthy humans. **Arch. Surg.**, Philadelphia, v.123, p. 1459-1464, 1988.
- OLSEN, P.S.; SCHROEDER, T.; AGERSKOV, K.; RODER, O. Surgery of abdominal aortic aneurysms: a survey of 656 patients. **J. Cardiovasc. Surg.**, Torino, v.32, p. 636-642, 1991.
- PAPE, C.; DWENGER, A.; REDEL, G. et al. Increased gut permeability after multiple trauma. **Br. J. Surg.**, Guildford, v.81, p.850-852, 1994.
- PARARAJASINGAM, R.; WEIGHT, S.C.; BELL, P.R. et al. Endogenous renal nitric oxide metabolism following experimental aortic crossclamp-induced ischaemia-reperfusion injury. **Br. J. Surg.**, Guildford, v.86, n.6, p.795- 799, June 1999.
- PATERSON, I.S.; KLAUSNER, J.M.; PUGATCH, R.; ALLEN, P. et al. Noncardiogenic pulmonary edema after abdominal aortic aneurysm surgery. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v.209, n.2, p.231-236, Feb. 1989.
- REYNOLDS, J.V. Gut barrier function in the surgical patient. **Br. J. Surg.**, Guildford, v.83, p.1668-1669, 1996.
- ROUMEN, R.M.H.; VLIET, A.; WEVERS, R.A.; GORIS, R.J.A. Intestinal permeability is increased after major vascular surgery. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v.17, n.4, p.734-737, Apr. 1993.
- ROUMEN, R.M.H.; FRIELING, J.T.M.; van TITS, H.W.H.J. et al. Endotoxemia after major vascular operations. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v. 18, n.5, Nov. 1993.
- ROSENTHAL, S.M. Experimental chemotherapy of burns and shock. Production of traumatic shock in mice and therapy with mouse serum and sodium salts. **Public Health Reports**, Boston, v.58, n.39, p.1429-1436, Sept. 1943.
- RUSH B.F.; SORI A.J.; MURPHY T.F. Endotoxemia and bacteremia during hemorrhagic shock: the link between trauma and sepsis? **Ann. Surg.**, Philadelphia, v.207, n.5, p. 549-554, May. 1988.
- SAADIA, R. Trauma and bacterial translocation. **Br. J. Surg.**, Guildford, v. 82, p. 1243-1244, 1995.
- SCHLAG, M.G.; CLARKE, S.; CARSON, M.W.; HARIS, K.; POTTER, R.F. The effect of mannitol versus dimethyl thiourea at attenuating ischemia- reperfusion induced injury to skeletal muscle. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v.29, n.3., Mar. 1999.
- SIEGEL, Sidney. **Estatística não paramétrica**. 3. ed. New York: McGraw- Hill do Brasil, 1981. p.209-217.

- SOONG, C.V.; BLAIR, P.H.B.; HALLIDAY, M.I.; et al. Bowel ischemia and organ impairment in elective abdominal aortic aneurysm repair. **Br. J. Surg.**, Guildford, v.81, p.965-968, 1994.
- SCHUMER, W.; DAS GUPTA, T.K.; MOSS, G.S.; NYHUS, L.M. Effect of endotoxemia on liver cell mitochondria in man. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v.171, n.6, p.875-882, June 1970.
- SVENSSON, L.G.; CRAWFORD, E.S. **Cardiovascular and vascular disease of the aorta**. New York: W. B. Saunders Company, 1997.
- STEPHENSON, K.; HARVEY, S.A.K.; MUSTAFA, S.B.; et al. Endothelin association with cultured rat Kupffer cell: characterization and regulation. **Hepatology**, Philadelphia, v.22, n.3, p.896-905, Sept. 1995.
- STROCK, P.E.; MAJNO, G. Vascular responses to experimental tourniquet ischemia. **Surg. Gynecol. Obstet.**, Chicago, p.309-318, Aug. 1969 (A).
- STROCK, P.E.; MAJNO, G. Microvascular changes in acutely ischemic rat muscle. **Surg. Gynecol. Obstet.**, Chicago, p.1213-1224, Dec. 1969 (B).
- SWANK, G. M.; DEITCH, E. A. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. **World J. Surg.**, New York, v. 20, n. 4, p. 411-417, May. 1996.
- TRAYA, G. **Estudo de translocação bacteriana, endotoxemia e fator de necrose tumoral alfa em modelo experimental de obstrução biliar extra-hepática**. Curitiba-1999. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica)-Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- van DEVENTER, S.J.; BULLER, H.R.; ten CATE, J.W.; et al. Endotoxaemia: an early predictor of septicaemia in febrile patients. **The Lancet**, London, p.605- 609, Mar. 1988.
- van GOOR, H.; ROSMAN, C.; GROUND, J. et al. Translocation of bacteria and endotoxin in organ donors. **Arch. Surg.**, Chicago, v.129, p.1063-1066, Oct. 1994.
- WALKER Jr., W.F.; HOMBERGER, D.G. **Anatomy and dissection of the rat**. 3. ed. New York: W.H. Freeman, 1997.
- WELLS, C.J.; MADDAUS, M.A.; SIMMONS, R.L. Role of the macrophage in the translocation of intestinal bacteria. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 122, p. 48-53, Jan. 1987.
- WELCH M.; BAGUNEID, M.S.; McMAHON, R.F. et al. Histological study of colonic ischaemia after aortic surgery. **Br. J. Surg.**, Guildford, v.85, p.1095-1098, 1998.

- WEISER, M.R.; WILLIAMS, J.P.; MOORE, F.D. et al. Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement. **J. Exp. Med.**, New York, v.183, p.2343-2348, May 1996.
- YASSIN, M.M.I.; BARROS D'SA, A.A.B.; PARKS, T.G.; ABDULKANDIR, A.S.; PATH, M.R.C. et al. Mortality following lower limb ischaemia- reperfusion : a systemic inflammatory response? **World J. Surg.**, New York, v.20, n.8, p.961-967, Oct. 1996.
- YASSIN, M.M.I.; BARROS D'SA, A.A.B.; PARKS, T.G.; McCAIGUE, M.D. et al. Lower limb ischaemia-reperfusion alters gastrointestinal structure and function. **Br. J. Surg.**, Guildford, v.84 , p.1425-1429, 1997.
- YASSIN, M.M.I.; BARROS D'SA, A.A.B.; PARKS, T.G.; SOONG, C.V. et al. Lower limb ischemia- reperfusion injury causes endotoxaemia and endogenous antiendotoxin antibody consumption but not bacterial translocation. **Br. J. Surg.**, Guildford, v.85, p.785-789, 1998.
- YOUNES, M.; MOHR, A.; SCHOENBERG, M. H.; et al. Inhibition of lipid peroxidation by superoxide dismutase following regional intestinal ischemia and reperfusion. **Res. Exp. Med.**, Berlin, v.187, n.9, 1987.
- ZIMMERMAN, B.J.; GRANGER, D.N. Reperfusion injury. **Surg. Clin. North. Am.**, Philadelphia, v.72, n. 1, p. 65-83, Feb. 1992.
-