

Ligia Márcia Contrin

**A Tirosina como Marcador de Lesão
Intestinal na Isquemia Mesentérica**

**São José do Rio Preto
2005**

Ligia Márcia Contrin

**A Tirosina como Marcador de Lesão
Intestinal na Isquemia Mesentérica**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas.

Orientador: Profa. Dra. Suzana M. A. Lobo

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Navegantes

**São José do Rio Preto
2005**

Contrin, Ligia Márcia

A Tirosina como Marcador de Lesão Intestinal na Isquemia
Mesentérica / Ligia Márcia Contrin

São José do Rio Preto, 2005

43 p.;

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do
Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas

Orientadora: Profa. Dra. Suzana M. A. Lobo

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Navegantes

1. Isquemia intestinal; 2. marcador de isquemia; 3. tirosina;
4.Lactato; 5.Tonometria gástrica; 6. Coelhos .

Sumário

Dedicatória.....	i
Agradecimentos	ii
Epígrafe	v
Lista de Quadro.....	vi
Lista de Figuras.....	vii
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	viii
Resumo.....	x
Abstract.....	xii
1. Introdução	01
1.1. Isquemia Intestinal	02
1.2. Objetivos	08
2. Métodos	09
2.1. Modelo Animal	11
2.2. Procedimento Cirúrgico.....	12
2.3. Perfusado Luminal Intestinal	12
2.4. Procedimentos	14
2.5. Métodos Analíticos.....	14
2.5.1. Tonometria	14
2.5.2. Metodologia da Tirosina	15
2.5.3. Critérios para Avaliação do Grau de Lesão da Túnica Mucosa.....	15
2.6. Metodologia Estatística	16
3. Resultados.....	17

3.1. Análise Geral.....	18
3.2. Dados Hemodinâmicos	18
3.3. Capnografia Regional.....	20
3.4. Medidas das Concentrações Plasmáticas de Lactato	21
3.5. Medidas das Concentrações de Lactato no Perfusado Luminal Intestinal.....	22
3.6. Medidas das Concentrações de Tirosina no Perfusado Luminal Intestinal.....	23
3.7. Medidas das Concentrações de Tirosina no Plasma	24
3.8. Avaliação das Lesões Histológicas	25
4. Discussão	26
5. Conclusão.....	34
6. Referências Bibliográficas	36

Ao meu esposo, **Alexandre Lins Werneck**, que além do amor, carinho e compreensão, muito contribuiu para a realização desta dissertação, pela paciência, pela auto-estima, pela confiança, pelo companheirismo, pelos ensinamentos do inglês instrumental, pelas horas de traduções dos artigos, pela leitura e releitura das correções da dissertação, acreditando sempre e apoiando-me.

À minha filha **Ana Carolina**, que embora não entendesse minha ausência, compreendia que muitas vezes não estava com ela por uma razão especial.

A **DEUS**, razão do meu existir...

Aos meus **Pais (Anísio e Amélia)**, de quem recebi amor, carinho e compreensão, essenciais para a construção da minha vida pessoal e profissional, pelo que sou hoje.

Aos meus **Irmãos (Denílson e Fábria)**, pela certeza de sempre poder contar com vocês.

A minha filha, **Ana Carolina**, que aceitou minha ausência e o estresse contínuo na elaboração, execução e finalização desta dissertação.

A meu esposo **Alexandre Lins Werneck**, que soube renunciar, por diversas vezes agüentando meus desabafos e os meus estresses, apoiando-me nessa luta, para que eu terminasse a dissertação.

A minha orientadora **Profa. Dra. Suzana M. A. Lobo**, que não relutou em me orientar, por acreditar na minha capacidade pessoal e profissional, pelo constante incentivo e pela amizade.

Ao meu co-orientador **Prof. Dr. Luiz Carlos Navegantes**, pela contribuição e disponibilidade durante o desenrolar deste trabalho.

Aos meus amigos e confidentes das terças feiras durante a realização da cirurgia experimental, **Dra. Suzana Peres** e o médico **Marcio Mussolini** pelo estímulo, contribuição e disponibilidade no decorrer deste trabalho.

Aos Profs. **Dr. Sergio Mussi Guimarães** e **Dra. Vânia P. Delarco**, pela contribuição no exame de qualificação.

Ao meu colaborador **Eduardo C. Lira**, pela realização das dosagens de tirosina, pela paciência e boa vontade com que sempre me recebeu.

As enfermeiras da **UTI GERAL**, em especial as enfermeiras **Sônia Portella de Abreu** e **Adriana Carta** pelo apoio durante a fase do trabalho experimental.

A toda equipe do **Biotério da FAMERP**, pela paciência e boa vontade com que sempre me receberam.

A toda equipe do **Laboratório Central da FUNFARME**, pela realização dos exames.

Aos colegas do Departamento de Enfermagem Especializada da FAMERP, em especial a **Beatriz Barco** pela colaboração e apoio na realização deste trabalho.

Às minhas companheiras de área, **Ana Maria Silveira** e **Dra. Lucia Marinilza Beccaria**, pela compreensão do meu estresse e pelo apoio recebido.

Adriana Pellegrini dos Santos e **Margarete A. Baptista**, juntas, compartilhamos muitas experiências no caminhar desta jornada, nas aulas de inglês, de português, nas viagens e nas horas de reflexão. Quando relembrar os bons momentos, com certeza, vocês estarão neles.

Familiares, Professores, Amigos, Colegas, Colaboradores e **todos** que compartilharam e compartilham comigo os caminhos da vida, a realização desse trabalho era um sonho, que muitas vezes parecia inatingível, portanto, agradeço carinhosamente a cada um que contribuiu para que o mesmo se tornasse realidade.

Muito obrigada, a todos!

“Ocasionalmente, temos a vida de uma pessoa em nossas mãos; quase sempre, sua dignidade”

Leah Cutin

Lista de Quadro

Quadro 1. Critérios para graduação de lesão da mucosa ileal.....	16
------------------------------------------------------------------	----

Lista de Figuras

Figura 1.	Fotografia demonstrando os cateteres posicionados na luz do íleo, delimitando um segmento do intestino.....	13
Figura 2.	Perfil de pressão arterial média.....	19
Figura 3.	Perfil de pressão átrio direito.....	19
Figura 4.	Perfil do fluxo da artéria mesentérica superior.....	20
Figura 5.	Perfil do gradiente de PCO ₂	21
Figura 6.	Perfil do lactato plasmático.....	22
Figura 7.	Perfil das concentrações de lactato no perfusado intestinal....	23
Figura 8.	Perfil das concentrações de tirosina no perfusado intestinal...	24
Figura 9.	Perfil das concentrações de tirosina plasmática.....	24
Figura 10.	Grau de lesão histológica.....	25

Lista de Abreviaturas e Símbolos

ADH	-	Álcool Desidrogenase
AMS	-	Artéria mesentérica superior
ANOVA	-	Análise de variância
ATP	-	Trifosfato da adenosina
CO ₂	-	Dióxido de carbono
DC	-	Débito cardíaco
DHL	-	Desidrogenase láctica
FS	-	Fluxo sangüíneo
g	-	Gramas
h	-	Hora
HAES	-	Amido hidroxietil
IMA	-	Isquemia mesentérica aguda
mg/kg	-	Miligramas/kilogramas
µg/kg	-	Microgramas/kilogramas
ml	-	Mililitro
NS	-	Não significativa
O ₂	-	Oxigênio
PaCO ₂	-	Pressão parcial arterial de dióxido de carbono
PAD	-	Pressão do átrio direito
PAF	-	Fator ativador de plaquetas
PAM	-	Pressão arterial média
PBS	-	Solução Fosfatada Tamponada
PCO ₂	-	Pressão parcial de dióxido de carbono
PCO _{2i}	-	Pressão parcial de dióxido de carbono da mucosa intestinal
pH	-	Potencial de hidrogênio

pHi	- pH intramucoso
PLI	- Perfusado luminal intestinal
Q _{AMS}	- Fluxo sanguíneo na artéria mesentérica superior
Q _{aorta}	- Fluxo sanguíneo na aorta
RL	- Ringer lactate
SF 0,9%	- Soro fisiológico 0,9%
TeO ₂	- Taxa de extração de O ₂
TGI	- Trato gastrintestinal
VC	- Volume corrente
VCI	- Veia cava inferior
VO ₂	- Consumo de O ₂
VP	- Veia porta
XD	- Xantino- desidrogenase
XO	- Xantino-oxidase
μ	- Micro
μg	- Micrograma
μg/kg/min	- Microgramas por kilogramas por minuto
μl	- Microlitro
3-MH	- 3-metil-histidina
Torr	- Torr (<i>Torricelli</i>), unidade de pressão suficiente para suportar uma coluna de mercúrio de 1 mm a 0°C contra aceleração padrão da gravidade.

Introdução: O trato gastrintestinal exerce um papel central na resposta catabólica da proteína após lesão ou infecção. Avaliaram-se a tirosina (um índice de proteólise global) e a liberação de lactato no perfusado do lúmen intestinal durante a ligação da artéria mesentérica superior (AMS). O objetivo deste estudo é determinar se o fluxo de tirosina proveniente do compartimento intracelular para o lúmen poderia ocorrer durante lesão do intestino induzida por isquemia. **Métodos:** Catorze coelhos da raça *New-Zealand* foram divididos em dois grupos (grupo I: controle, n=6 e grupo II: isquemia, n=8). Os fluxos da artéria mesentérica superior (Q_{SMA}) e da aorta (Q_{aorta}) foram mensurados usando sondas de fluxo ultra-sônicas. Isolou-se, para realizar a perfusão, um segmento do íleo usando dois cateteres *multilumen* com balões inflados para delimitar um segmento fechado. Em um segundo segmento intestinal, colocou-se um cateter de tonometria (TRIP® Tonometry Catheter, Datex, Finland). Submeteram-se os animais no grupo II à ligação da AMS após mensurações iniciais. Determinaram-se as concentrações de lactato e tirosina no soro e no perfusado do lúmen intestinal (PLI). Analisou-se a Tirosina pelo método de fluorometria como descrito anteriormente. (1) **Resultados:** As concentrações de lactato aumentaram significativamente no PLI após ligação da AMS em 4 horas no grupo II (de $0,1 \pm 0,7$ mEq/l para $3,3 \pm 1,6$ mEq/l em 2 horas) em comparação com o controle (de $0,1 \pm 0,5$ mEq/l para $0,3 \pm 0,1$ mEq/l em 2 horas) ($p < 0,05$). A tirosina no lúmen aumentou significativamente durante a isquemia em comparação com o controle em 2 horas (de $10,1 \pm 7,7$ mM/ml para 93 ± 63 mM/ml, grupo II; de $9,9 \pm 7,8$ mM/ml para $25,6 \pm 24,0$ mM/ml,

grupo I, $p < 0,05$). **Conclusão:** O fluxo da tirosina proveniente do compartimento intracelular para o lúmen ocorreu nesse modelo, sugerindo uma proteólise induzida pela isquemia intestinal, e um potencial papel para a tirosina como um marcador da lesão celular.

Palavras-Chave: 1. Isquemia intestinal; 2. Marcador de isquemia; 3. Tirosina; 4. Lactato; 5. Tonometria gástrica; 6. Coelhos.

Abstract

Introduction: The intestinal tract plays a central role in the protein catabolic response after infection or injury. Tyrosine (an index of overall proteolysis) and the release of lactate in intestinal luminal perfusate (ILP) during ligation of the superior mesenteric artery (SMA) were assessed. The present study aims to determine whether tyrosine flow from intracellular compartment to lumen could occur during ischemia induced-gut injury. **Methods:** Fourteen New-Zealand rabbits were allocated into 2 groups (group I: control (n=6) and group II: ischemia (n=8). SMA (Q_{SMA}) and aortic (Q_{aorta}) flows were measured using ultrasonic flow probes. A segment from the ileum was isolated using two multilumen tubes with inflated balloons to delimit a closed segment to be perfused. In a second gut segment, a tonometric catheter (TRIP® Tonometry Catheter, Datex, Finland) was placed. Animals in group II were submitted to ligation of SMA after baseline measurements. The concentrations of tyrosine and lactate in intestinal lumen of both serum and perfusate were determined. Tyrosine was assayed by the fluorometric method as previously described. (1) **Results:** The lactate concentrations significantly increased in ILP after the ligation of SMA in 4 hours (from 0.1 ± 0.7 mEq/L to 3.3 ± 1.6 mEq/L in 2 hours) compared to control group (from 0.1 ± 0.5 mEq/L para 0.3 ± 0.1 mEq/L in 2 hours) ($p < 0.05$). Luminal tyrosine significantly increased during ischemia compared to control group in 2 hours (from 10.1 ± 7.7 mM/mL to 93 ± 63 mM/mL, group II; from 9.9 ± 7.8 mM/mL to 25.6 ± 24.0 mM/mL, group I, $p < 0.05$). **Conclusion:** Tyrosine flow from intracellular compartment to lumen

occurred in this model suggesting ischemia-gut-derived proteolysis and a potential role for tyrosine as a marker of cell injury.

Key-Words: 1. Intestinal ischemia; 2. Ischemia marker; 3. Tyrosine; 4. Lactate;
5. Gastric tonometry; 6. Rabbit.

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Isquemia Intestinal

O envelhecimento da população está intimamente relacionado ao progresso da medicina e a um maior acesso de pessoas ao sistema de saúde, que em última análise, é o reflexo do desenvolvimento sócio-econômico do país.^(1,2)

Os avanços médicos não só propiciaram um aumento na sobrevida da população, como também contribuíram para que entidades nosológicas, como a isquemia mesentérica, pouco diagnosticada no passado, se tornassem freqüentes nos dias de hoje.^(1,2)

Os processos isquêmicos, conseqüentes às lesões arteriais comumente observadas, e motivos de intensos estudos no território cerebral e cardíaco, são raramente diagnosticados no aparelho gastrointestinal.⁽³⁾ Os processos oclusivos agudos do sistema gastrointestinal acometem aproximadamente 2.000 pessoas a cada ano na Inglaterra, em contraste com aproximadamente 100.000 casos de infarto agudo do miocárdio. Essa diferença tão marcante reside no fato, entre outros, de que as artérias do trato intestinal apresentam uma rica rede anastomótica entre suas principais tributárias. Todavia, os processos isquêmicos decorrentes de lesão intestinal desempenham um papel central em uma variedade de condições clínicas, como transplantes de órgãos, cirurgias cardíacas e vasculares, e enterocolite necrotizante em neonatos.⁽⁴⁾

A isquemia mesentérica consiste na insuficiência aguda ou crônica de fluxo sanguíneo (FS) para todas as partes, ou para apenas partes do intestino, impedindo a nutrição adequada dos órgãos correspondentes. Existe variabilidade nos padrões de suprimento sanguíneo para o trato gastrointestinal (TGI), mas em geral o estômago e o duodeno, são irrigados pelo tronco celíaco, o intestino delgado e 2/3 do intestino grosso, pela artéria mesentérica superior (AMS) e o colo descendente, pela artéria mesentérica inferior.⁽⁵⁾ As células musculares lisas dos vasos (controle intrínseco), metabólitos locais e um componente do sistema nervoso regulam o fluxo intestinal de maneira complexa.

Períodos prolongados de isquemia causam morte celular e conseqüente deterioração funcional do órgão. Adicionalmente, após a restauração do fluxo sanguíneo, o tecido morto iniciará o desenvolvimento de uma resposta inflamatória. A xantino-oxidase (XO), encontrada no endotélio, bem como no epitélio intestinal, tem um papel importante como mediadora da lesão de reperfusão.⁽⁶⁾ Em condições normais, essa substância existe predominantemente como xantino-desidrogenase (XD). Contudo, com a isquemia, a xantino-desidrogenase é convertida em xantino-oxigenase. Ao mesmo tempo, ocorre a diminuição de trifosfato da adenosina (ATP) com aumento dos níveis de metabólitos de purina: hipoxantina e xantina. Com a reperfusão, o oxigênio torna-se disponível e ocorre a oxidação destes metabólitos através da xantino-oxidase, gerando degradação de metabólitos reativos de oxigênio os quais causam lesão tecidual.^(6,7)

A produção de radicais livres durante a fase de reperfusão, seguindo a isquemia, é a principal causa de lesão tecidual. Períodos de isquemia seguidos de reperfusão determinam maior lesão na túnica da mucosa do intestino, do que exclusiva isquemia.^(7,8) A isquemia seguida de reperfusão, ativa a fosfolipase A2, o fator ativador de plaquetas (PAF) e outros derivados eicosanóides que agem como quimiotáticos. A consequência mais conhecida do estresse oxidativo é a peroxidação lipídica. A formação de radical peróxil danifica diretamente a membrana celular, modificando sua permeabilidade e sua integridade.⁽⁹⁾

Embora o mecanismo de dano intestinal ainda permaneça duvidoso, é relatado o aumento da permeabilidade vascular e leucoseqüestração, além das próprias lesões nas túnicas mucosas, como responsáveis por toda a gama de falências orgânicas que se instala. Adicionalmente, polimorfonucleares aderidos ao endotélio liberam grânulos contendo NADPH-oxidase dependente dos metabólitos reativos do oxigênio ou uma variedade de proteases e elastases, que interagem sinergicamente para produzir lesão endotelial.⁽¹⁰⁾ A lesão da túnica mucosa do intestino é, potencialmente, danosa em virtude da possibilidade de quebra da barreira intestinal por alterações da permeabilidade permitindo a translocação de germes e de toxinas para a corrente sangüínea.⁽¹¹⁾

A isquemia mesentérica é uma das mais graves doenças circulatórias do trato gastrointestinal.^(1,2,12) O diagnóstico deve ser suspeito em pacientes idosos com dor abdominal aguda, ou crônica, ou com sintomas gastrintestinais inexplicados. Tem como principais causas: tromboses intravasculares,

fenômenos embólicos, oclusões mecânicas ou estados de choque. Dependendo do tempo de evolução, esse processo pode resultar em necrose intestinal ou restabelecimento da circulação com reperfusão do tecido isquêmico.^(2,12) Em algumas circunstâncias de infarto mesentérico um obstáculo mecânico não está presente, recebendo por isso a denominação de não oclusivo.⁽¹³⁾ A causa mais comum é o baixo débito cardíaco (DC), decorrente dos estados de choque. Mesmo, os vasopressores utilizados no tratamento de estados de choque e os digitálicos, são substâncias capazes de induzir vasoconstrição mesentérica, desencadeando ou agravando a isquemia tecidual.⁽¹³⁾

Na isquemia mesentérica aguda e nos transplantes intestinais para a síndrome do intestino curto, ocorrem lesões de isquemia/reperfusão que limitam o sucesso das técnicas operatórias praticadas.⁽¹⁴⁾ Pesquisadores estudam soluções para limitar a lesão tecidual decorrente do processo isquemia/reperfusão.⁽¹⁵⁻¹⁸⁾

A avaliação peri-operatória de segmentos intestinais, possivelmente, isquêmicos apresenta-se sempre como tarefa de extrema dificuldade para o cirurgião, persistindo controvérsias acerca do melhor método.^(19,20) A determinação e ressecção precisas da porção comprometida do intestino são fundamentais para o sucesso do procedimento.^(14,21) A não-ressecção de porções inviáveis do intestino leva, geralmente, à deiscência da anastomose e à sepse, da mesma forma que a permanência de intestino ainda viável, porém, já com lesões irreversíveis em sua parede, pode fazer com que o paciente evolua com complicações, como a colite ou a estenose intestinal.⁽¹³⁾ Por outro

lado, a ressecção desnecessária de grande extensão de intestino ainda viável pode, por outro lado, levar a outras complicações, como a chamada Síndrome do Intestino Curto, implicando em significativa redução da capacidade absorptiva do paciente e até na necessidade de nutrição parenteral.^(14,19)

A terapêutica da isquemia mesentérica continua a representar um desafio para os profissionais da saúde. Apesar dos avanços no seu tratamento com o uso dos agentes antimicrobianos e medidas de suporte vital, estes têm se mostrado insuficientes para diminuir a morbidez e mortalidade. Devido a dificuldades no diagnóstico, o tratamento desses pacientes é freqüentemente retardado. Quando a necrose intestinal já está instalada, as taxas de mortalidade variam de 50% a 80%.⁽³⁾ A presença de marcadores fidedignos de isquemia seria de grande auxílio e, uma vez aplicados, poderiam representar um grande avanço diagnóstico.

Na prática clínica não existem marcadores de elevada sensibilidade e especificidade para detectar alterações isquêmicas em segmentos intestinais. Sinais como leucocitose, acidose láctica e hiperamilasemia têm sido utilizados. Todavia, estas alterações são pouco específicas e aparecem com elevada freqüência em uma grande variedade de patologias de etiologia não-isquêmica, como na pancreatite ou perfurações de vísceras. Outros indicadores de isquemia intestinal foram avaliados em diferentes estudos com melhores resultados, como a amônia, a álcool-desidrogenase (ADH), a fosfatase alcalina intestinal, fosfato sérico e a tonometria gástrica, entre outros.^(5,22-24)

A técnica da tonometria gástrica, usada para medir o carbono produzido por células disóxicas na túnica mucosa do TGI, é considerada um grande

passo na monitorização da oxigenação tecidual regional durante os estados de choque.^(5,11) Baseia-se no princípio de que o dióxido de carbono (CO_2) se difunde livremente pelos tecidos e membranas celulares. A técnica clássica de tonometria gástrica utiliza um tubo nasogástrico, com um balão de silicone preenchido com solução salina. Após um período que permite o equilíbrio da solução salina com a pressão parcial de CO_2 (PCO_2) do lúmen gástrico, uma amostra é obtida e analisada. A medida da PCO_2 luminal pela tonometria proporciona a estimativa da PCO_2 da túnica mucosa do estômago.⁽²⁵⁻²⁶⁾ A PCO_{2i} é um marcador fidedigno de disóxia tecidual. Contudo, o gradiente mucoso-arterial do PCO_2 ($\text{PCO}_2\text{-gap}$) tem sido difundido como uma medida mais fidedigna, pois corrige anormalidades sistêmicas do equilíbrio do CO_2 .^(27,28) Na prática clínica a tonometria gástrica vem sendo utilizada para avaliar a perfusão da túnica mucosa do estômago durante o choque. Contudo não avalia alterações localizadas no fluxo circulatório que ocorre no intestino, a menos que o cateter seja posicionado no segmento acometido.

Pacientes com isquemia mesentérica apresentam acidose láctica importante. No entanto, o lactato é simplesmente um indicador do estado anaeróbico, e a acidose láctica é um marcador de perfusão global deficiente, podendo estar presente em qualquer situação crítica que se associem as alterações circulatórias, como hipovolemia e ou intensa resposta inflamatória.^(25,27)

Em diferentes situações catabólicas o balanço protéico de determinados tecidos pode ser avaliado quantificando-se os aminoácidos tirosina e 3-metil-histidina (3-MH), liberados no meio de incubação de tecidos isolados *in vitro*

e/ou no interstício *in situ*.⁽²⁹⁾ Este modelo foi testado em músculo esquelético e cardíaco em diferentes estudos. A medida da taxa de liberação de tirosina pela fibra muscular reflete a degradação de todas as classes de proteínas e não distingue entre as proteínas miofibrilares e não-miofibrilares. A medida da 3-MH reflete a degradação de proteínas miofibrilares. O intestino é formado pelas camadas epiteliais e pelas túnicas serosa e muscular, apenas esta última é composta de músculo liso e contém proteínas miofibrilares. A isquemia determina lesão tecidual e, portanto, degradação de proteínas com liberação de aminoácidos na corrente sangüínea e nas estruturas circunvizinhas.

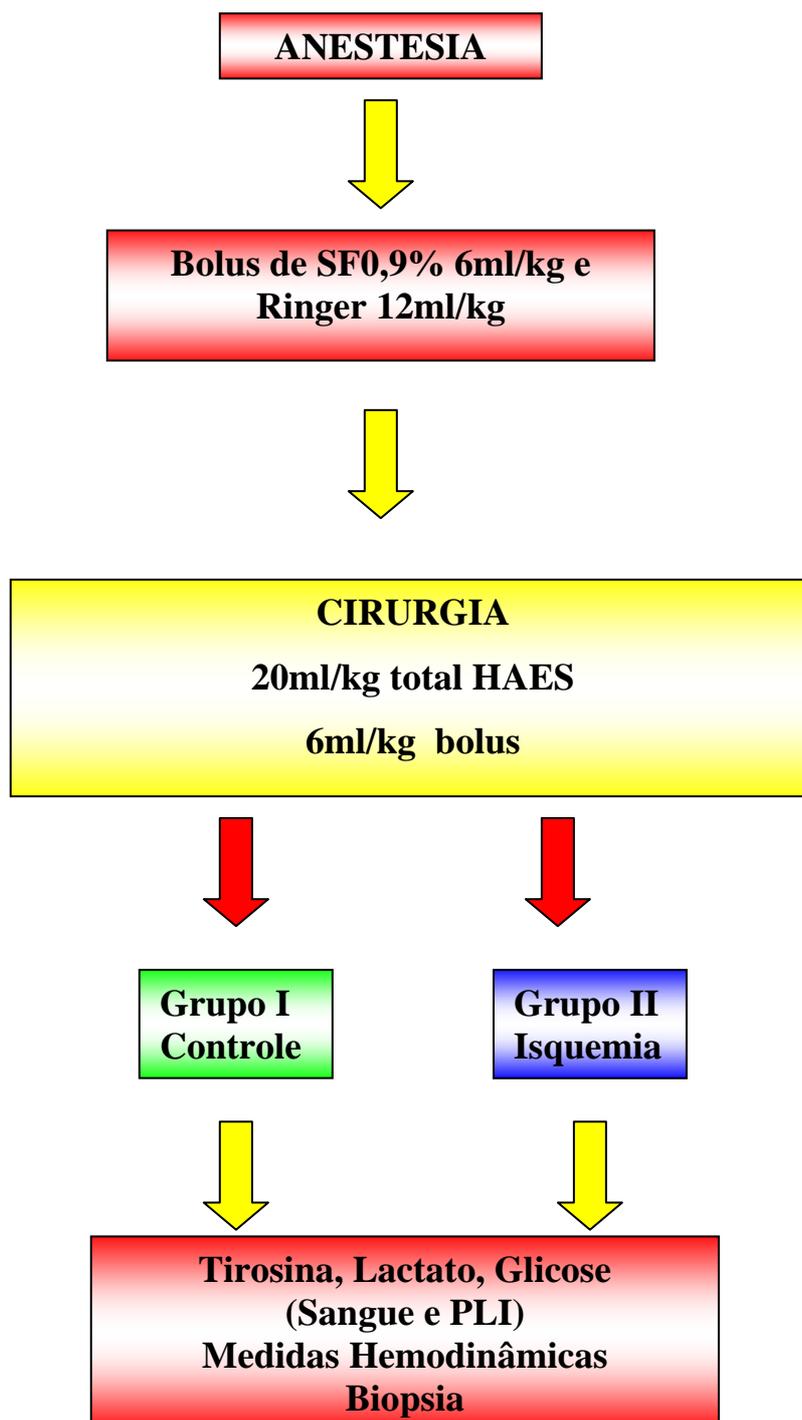
1.2. Objetivo

O presente estudo tem como objetivo avaliar o papel da tirosina derivada da degradação de proteínas presentes nas túnicas *mucosa e muscular do intestino* como um possível indicador de lesão em um modelo de isquemia induzida pela ligadura da artéria mesentérica superior, em coelhos.

2. MÉTODO

2. Método

DELINEAMENTO DO ESTUDO



2.1. Modelo Animal

Foram estudados 14 coelhos Nova Zelândia, fêmeas e machos, adultos, com peso variando de 2.500 a 3.400 g. Os animais foram manuseados de acordo com os princípios éticos da Comissão de Ética na experimentação animal (CEEA) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, após obtenção de aprovação da instituição. Os animais receberam água e ração *ad libitum* até o início do experimento.

Ketamina (20 mg/kg) e xylazina (4 mg/kg) foram administradas por via intramuscular, para indução anestésica e sedação. Após a tricotomia do abdome e pescoço o animal foi colocado na mesa cirúrgica em posição dorsal, com o pescoço hiperestendido, e teve suas patas fixadas com elásticos na mesa cirúrgica. O acesso venoso periférico foi obtido pela punção da veia marginal da orelha esquerda (Scalp nº 21 ou 23-G) para infusão de 20 ml de SF 0,9% em bolus e manutenção da hidratação.

Uma traqueostomia foi realizada, e os animais foram colocados sob ventilação mecânica (Ventilador Inter 5, Intermed) com volume corrente (VC) de 5 ml/kg e a FiO_2 foi ajustada para manter PaO_2 entre 80 e 120 mm Hg e, $PaCO_2$ entre 35 a 45 mm Hg. Paralisia neuromuscular foi mantida com a administração intermitente de 0,1 mg/kg *bolus* de pancurônio. Uma infusão contínua de Ketamina (15-35 mg/kg/h) foi iniciada três horas após a indução, para a manutenção da anestesia.

2.2. Procedimento Cirúrgico

Um cateter (20-G) de polietileno foi introduzido na artéria carótida para aferição contínua da pressão arterial média (PAM) e para a colheita de amostras de sangue arterial. Outro cateter (22-G) foi colocado na veia jugular, para aferição da pressão do átrio direito (PAD).

Uma laparotomia mediana foi realizada e analisadores de fluxo ultrassônicos (Transonic System Inc., Ithaca, NY) foram colocados na artéria mesentérica superior, próximos à origem do tronco celíaco e, na parte abdominal da aorta, para medidas contínuas do fluxo sanguíneo (Q_{AMS} e Q_{aorta}).

Segmentos do intestino foram delineados na parte média do íleo. Uma enterotomia foi realizada, na borda antimesentérica, para colocação de dois cateteres para irrigação (Cateter de Folley 8) e drenagem (Cateter de Folley 10) do líquido de perfusão da luz intestinal, de modo a delimitar um segmento de alça intestinal fechado, de 5 cm, fixado com sutura em bolsa.⁽²⁵⁾ Os balões foram delicadamente insuflados com soro fisiológico 0,9% e sob visualização direta, para evitar lesão de pressão, permitindo a oclusão de um segmento do intestino a ser estudado (Figura 1).

2.3. Perfusado Luminal Intestinal

A limpeza da luz do segmento intestinal foi realizada com a infusão cuidadosa de 20 ml de uma solução salina pelo cateter de Folley. A solução do PLI, composta de solução fosfatada tamponada (PBS), foi infundida a uma taxa

de 8 ml/h. A cada hora, durante 4 horas do experimento, o volume de PLI presente no segmento foi totalmente recuperado para análise.

Em um segundo segmento mais distal do íleo, um cateter de tonometria (TRIP® Tonometry Catheter, Datex, Finland) foi posicionado através de uma incisão na borda antimesentérica e fixado com sutura em bolsa.

A temperatura corporal foi mantida entre 35-39°C com focos de luz. As medidas basais foram obtidas após um período de recuperação de 45 a 60 minutos.

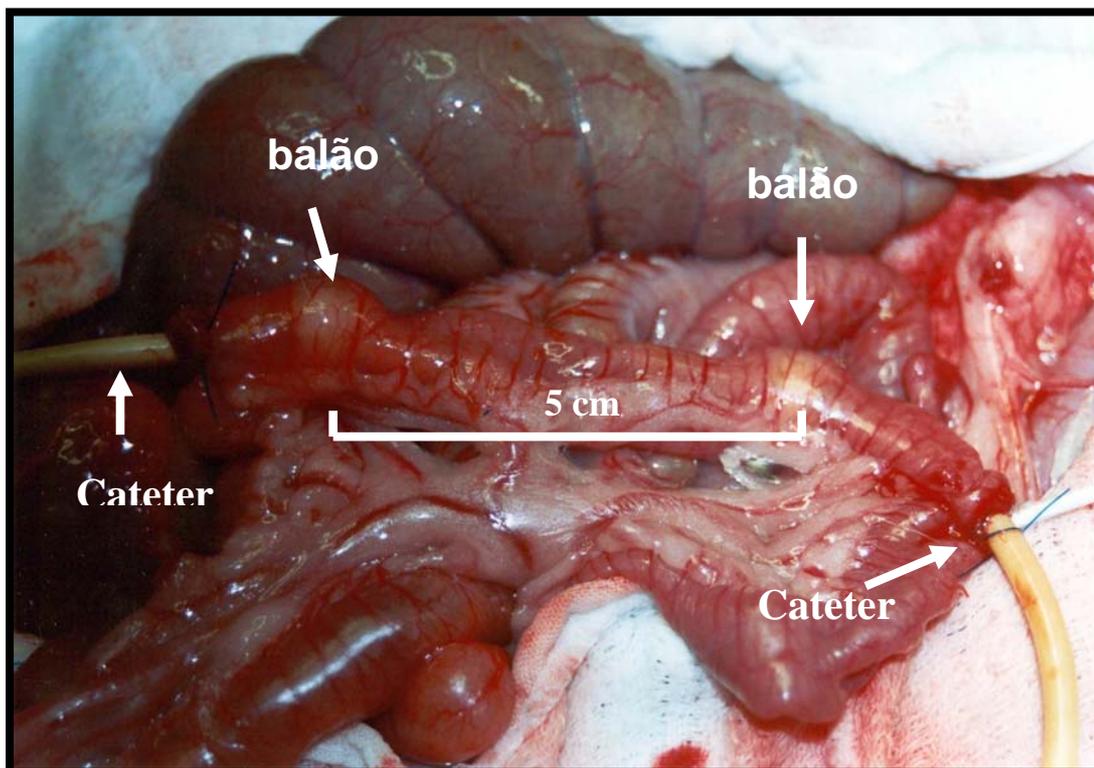


Figura 1. Cateteres posicionados na luz do íleo, delimitando um segmento do intestino.

2.4. Procedimentos

Os animais foram aleatoriamente classificados em 2 grupos: Grupo I (Controle), n=6, recebeu 12 ml/kg/h de Ringer lactato (RL); Grupo II (Isquemia) n=8, foi submetido à isquemia intestinal através da ligadura da AMS e recebeu 12 ml/kg/h de RL. Todos os grupos receberam *bolus* de 20 ml de soro fisiológico 0,9% após o término da cirurgia.

2.5. Métodos Analíticos

Após o período de estabilização do animal (45-60 min) foram realizadas as medidas basais de PAM, FC, temperatura retal, PAD, Q_{AMS} , Q_{aorta} e Ventilometria. Amostras de sangue arterial e de PLI foram coletadas a cada hora para análises de gases (ABL-5, Radiometer, Copenhagen, Denmark), lactato (EML 105 Radiometer, Copenhagen, Denmark) e tirosina (Fluorímetro).

2.5.1. Tonometria

Para a análise por tonometria, 1 ml de solução salina a 0,9% foi colocado no balão de silicone do tonômetro, e um tempo de equilíbrio de 45-60 min foi estabelecido antes das medidas. Os primeiros 0,7 ml aspirados foram desprezados, e a análise foi realizada imediatamente nos 0,3 ml restantes, em um analisador de gases sanguíneos (ABL 500 radiometer, Copenhagen,

Denmark). O gradiente mucoso íleo-arterial da PCO_2 (PCO_2 -gap) foi calculado, como a diferença entre a PCO_2 do íleo e a do sangue arterial.⁽³⁰⁾ As medidas foram realizadas a cada 1 h.

2.5.2. Metodologia da Tirosina

Para a análise da tirosina foram coletadas amostras de sangue arterial e PLI dos coelhos e centrifugados para posterior análise.

A tirosina foi analisada pelo método de Waalkes e Udenfriend.⁽³¹⁻³⁴⁾

2.5.3. Critérios para Avaliação do Grau de Lesão da Túnica Mucosa

Cada animal recebeu uma injeção letal de potássio 0,9% no final do experimento. Um segmento da parte distal do íleo foi imediatamente retirado, aberto pela borda antimesentérica e fixado em formol a 10%, para posterior processamento histológico. O grau de lesão da túnica mucosa foi avaliado no estudo histológico.⁽³⁵⁾ (Quadro 1).

2.6. Metodologia Estatística

Os resultados são apresentados como média \pm DP. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para medidas repetidas, com correção pelo teste de

Bonferroni para comparações múltiplas. O grau de lesão histológica foi avaliado com o teste de Mann-Whitney. Os testes estatísticos aplicados aceitaram como valores significantes, níveis de $p \leq 0,05$.

Quadro 1. Critérios para graduação de lesão da mucosa ileal.

Grau	Morfologia
0	Vilosidades bem constituídas, sem lise celular ou espaçamento entre as vilosidades
1	Formação do espaço subepitelial de Gruenhagen
2	Aumento do espaço subepitelial com levantamento moderado do epitélio para fora da lâmina própria da mucosa
3	Levantamento maciço do epitélio
4	Destrução das vilosidades com exposição da lâmina própria da mucosa e de capilares dilatados
5	Destrução de toda a túnica mucosa, hemorragia e ulcerações

3. RESULTADOS

3. RESULTADOS

3.1. Análise Geral

Foram estudados 14 animais divididos em 2 grupos, grupo I (controle) com 6 coelhos e grupo II (isquemia) com 8 coelhos. Todos os grupos receberam a mesma quantidade de fluídos em relação ao peso corporal.

3.2. Dados Hemodinâmicos

Após a oclusão da AMS, a PAM foi significativamente menor no grupo II do que no grupo I às 2 horas ($44,2 \pm 12,3$ mm Hg vs $68,0 \pm 23,4$ mm Hg, respectivamente; $p < 0,05$) e às 4 horas ($55,8 \pm 17,9$ mm Hg vs $78,8 \pm 20,9$ mm Hg, respectivamente; $p < 0,05$) (Figura 2). A PAD (Figura 3) foi menor no grupo II do que no grupo I ($5,2 \pm 1,8$ cm H₂O vs $9,7 \pm 2,7$ cm H₂O respectivamente, 2h; $p < 0,05$). O perfil do Q_{AMS} está representado na Figura 4.

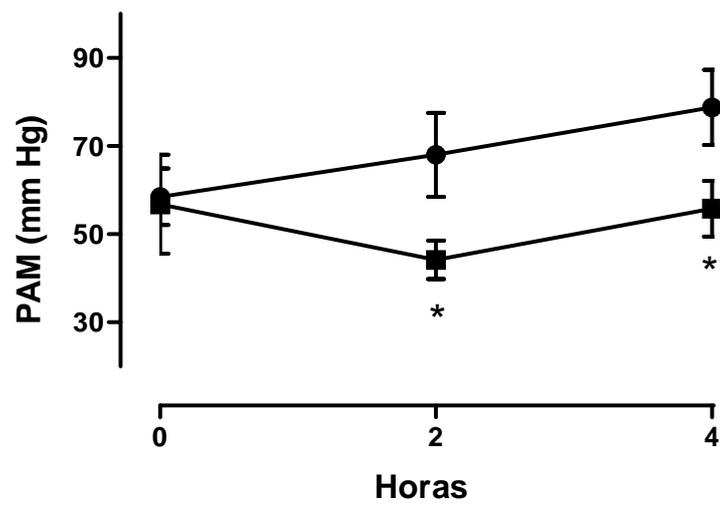


Figura 2. Perfil de pressão arterial média. Valores são apresentados como média/DP. *: $p < 0,05$ vs grupo I. (grupos: I: ●; II: ■).

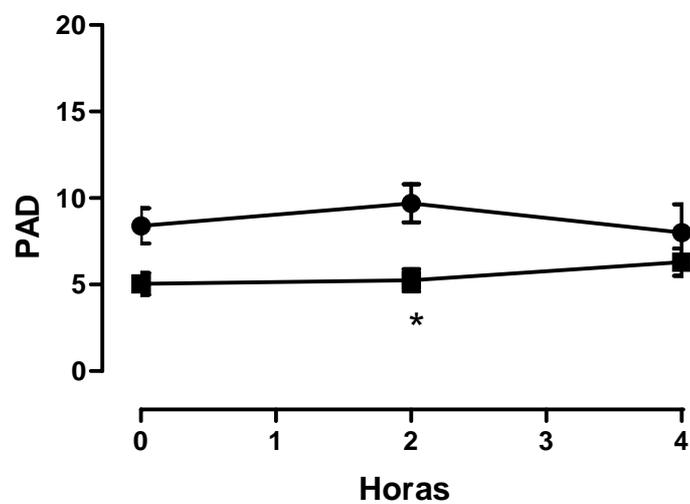


Figura 3. Perfil de pressão do átrio direito. Valores são apresentados como média/DP. *: $p < 0,05$ vs grupo I. (grupos: I: ●; II: ■).

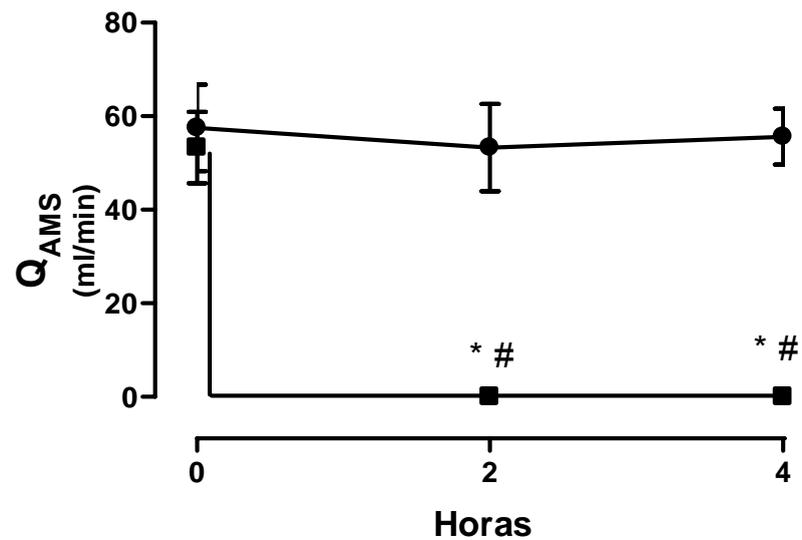


Figura 4. Perfil do fluxo da artéria mesentérica superior. Valores são apresentados como média/DP. *: $p < 0,05$ vs grupo I. #: $p < 0,05$ vs 0h. (grupos: I: ●; II: ■).

3.3. Capnografia Regional

O PCO_2 -gap do grupo II aumentou significativamente às 2h e 4h em comparação ao nível inicial (0h, -7 ± 19 torr; 2h, 43 ± 34 torr e 4h, 44 ± 28 torr; $p < 0.05$ para ambos). O PCO_2 -gap foi significativamente mais elevado no grupo II em comparação ao grupo I às 2h e 4h (43 ± 38 torr vs -12 ± 17 torr, 2h; 44 ± 28 torr vs $2,2 \pm 17$ torr, 4h; respectivamente; $p < 0,05$ para ambos) (Figura 5).

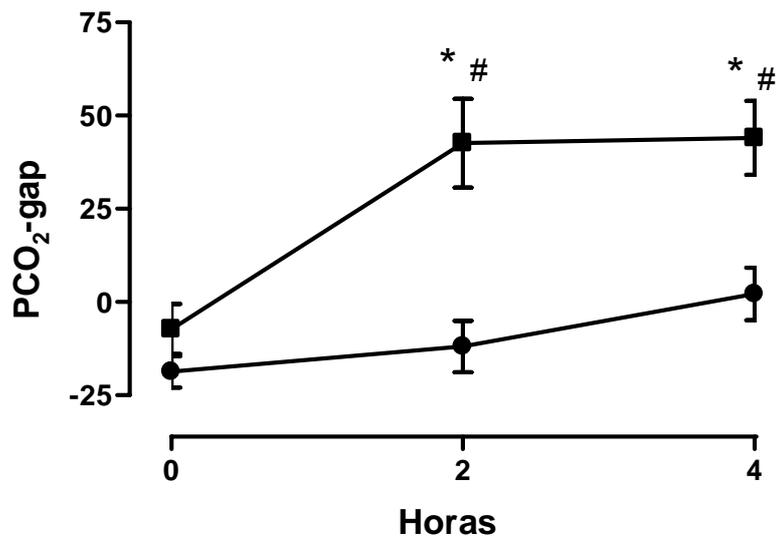


Figura 5. Perfil do gradiente de PCO₂. Valores são apresentados como média/DP *: p<0,05 vs grupo I. #: p<0,05 vs 0h. (grupos: I: ● ; II: ■).

3.4. Medidas das Concentrações Plasmáticas de Lactato

Níveis séricos de lactato plasmático foram semelhantes em ambos os grupos (Figura 6). Porém, houve um aumento significativo após 4 horas em comparação ao nível basal no grupo II (de $4,1 \pm 1,5$ mEq/l para $6,4 \pm 1,4$ mEq/l $p<0,05$).

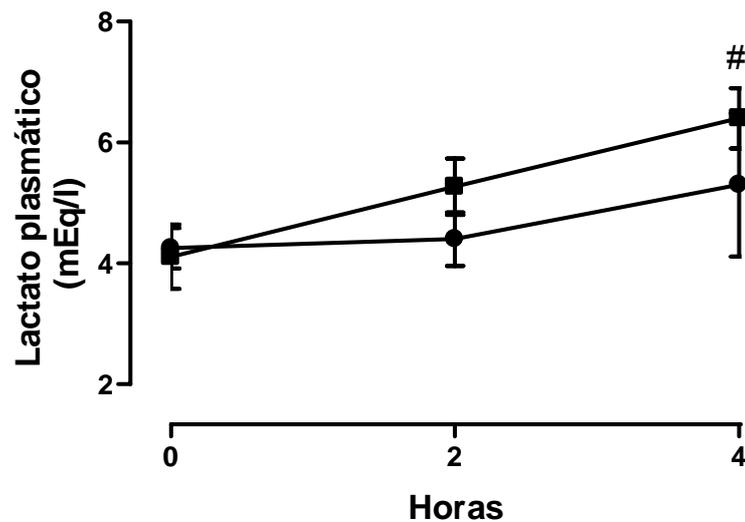


Figura 6. Perfil do lactato plasmático. Valores são apresentados como média/DP. #: $p < 0,05$ vs 0h. (grupos: I: ●; II: ■).

3.5. Medidas das Concentrações de Lactato no Perfusado Intestinal

As concentrações de lactato aumentaram significativamente no PLI após ligadura da AMS em 4h no grupo II (de $0,1 \pm 0,7$ mEq/l para $3,3 \pm 1,6$ mEq/l, $p < 0,05$) mas não no grupo I (de $0,1 \pm 0,05$ mEq/l para $0,3 \pm 0,1$ mEq/l, NS). As concentrações de lactato no PLI foram significativamente mais elevadas às 2h ($0,2 \pm 0,1$ mEq/l vs $3,5 \pm 1,2$ mEq/l) e 4h ($0,3 \pm 0,1$ mEq/l vs $3,3 \pm 1,6$ mEq/l) no grupo II do que no grupo I ($p < 0,05$ para ambos) (Figura 7).

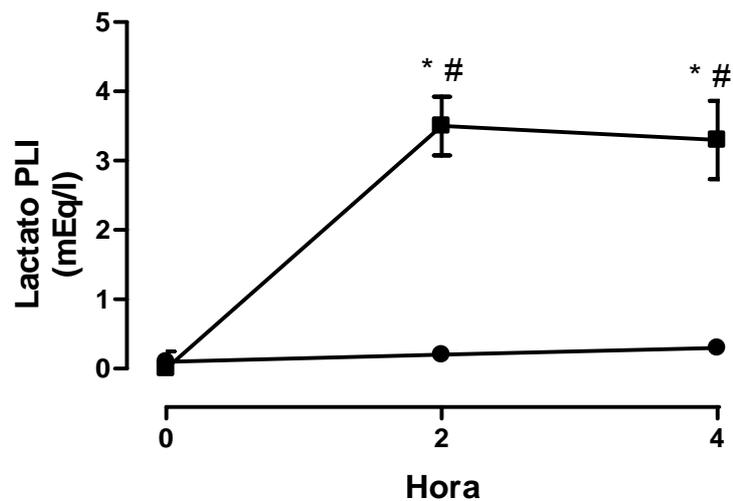


Figura 7. Perfil das concentrações de lactato no perfusado luminal intestinal.

Valores são apresentados como média/DP*: $p < 0,05$ vs grupo I #:

$p < 0,05$ vs 0h. (grupos: I: ●; II: ■).

3.6. Medidas das Concentrações de Tirosina no Perfusado Luminal Intestinal

A tirosina no PLI aumentou significativamente em comparação ao nível inicial no grupo II (0h, $10 \pm 7,7$ mM/ml; 2h, 93 ± 63 ; 4h, 73 ± 46 mM/ml, $p < 0,05$) mas não no grupo I (0h, $9,9 \pm 7,8$ mM/ml; 2h, $25,6 \pm 24$ mM/ml; 4h 54 ± 34 mM/ml, NS). A concentração de tirosina no PLI foi significativamente mais elevada no grupo II do que no grupo I às 2h (93 ± 63 mM/ml vs 26 ± 24 mM/ml; $p < 0,05$).

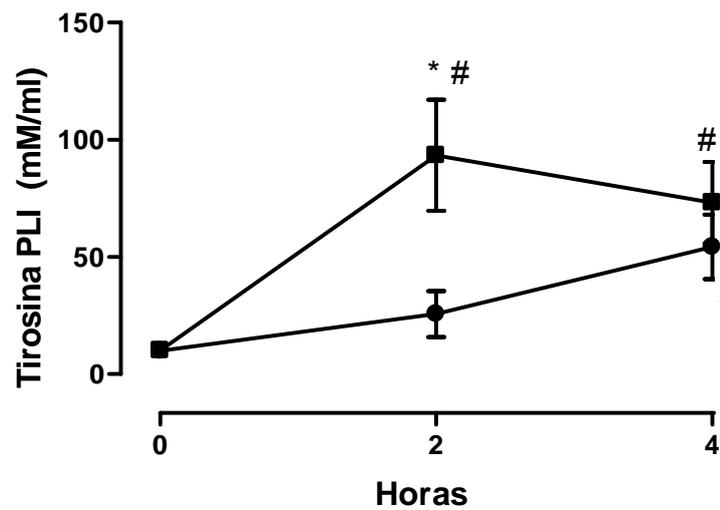


Figura 8. Perfil das concentrações de tirosina no perfusado luminal intestinal.

Valores são apresentados como média/DP *: $p < 0,05$ vs grupo I. #: $p < 0,05$ vs 0h. (grupos: I: ● ; II: ■).

3.7. Medidas das Concentrações de Tirosina no Plasma

Níveis séricos de tirosina foram semelhantes em ambos os grupos (Figura 9).

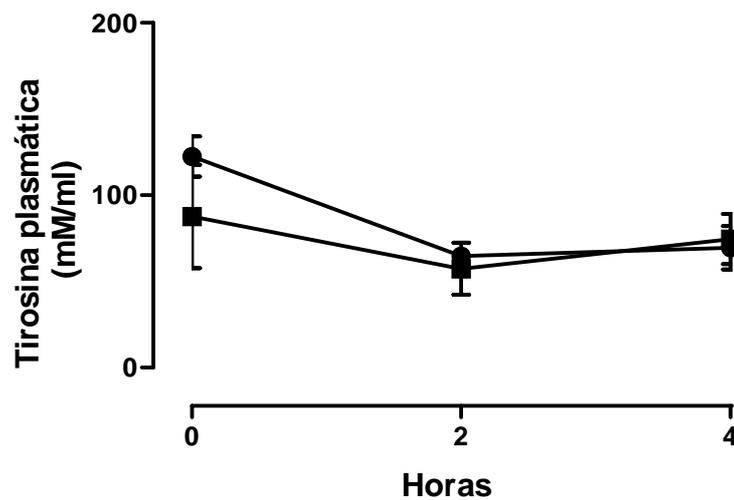


Figura 9. Perfil das concentrações de tirosina plasmática. Valores são apresentados como média/DP. (grupos: I: ● ; II: ■).

3.8. Avaliação das lesões histológicas

Os resultados de espécimes obtidos nos grupos I e II estão representados na Figura 10.

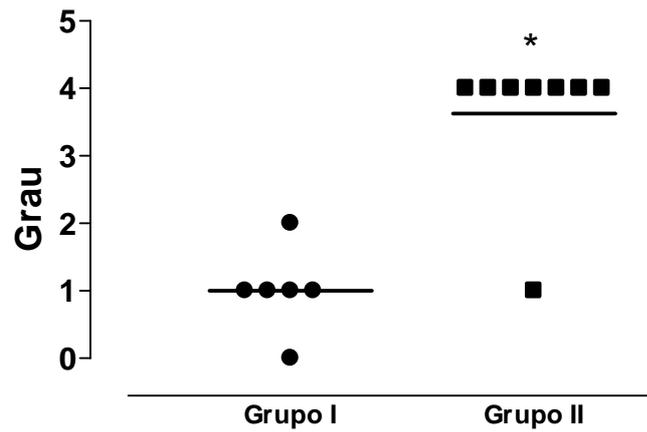


Figura 10. Grau da lesão histológica. *: $p < 0,05$ vs grupo I

4. DISCUSSÃO

4. DISCUSSÃO

Diversos marcadores biológicos foram avaliados como potenciais indicadores de lesão e isquemia intestinal, porém até o momento nenhum deles apresenta um perfil adequado para utilização rotineira na beira do leito. Nossos dados demonstraram que o presente modelo animal de ligadura da AMS por 4 horas proporcionou grave quadro de isquemia e lesão intestinal, representadas pelo aumento das concentrações de lactado e CO₂ no PLI seguido de importante alteração histológica. O aumento significativo da concentração de tirosina no PLI em animais com isquemia mesentérica em comparação ao grupo controle, a despeito de níveis séricos semelhantes nos dois grupos, sugere que este aminoácido, seja um potencial marcador de lesão decorrente da isquemia intestinal.

Em estudos animais, vários substratos foram avaliados como indicadores de isquemia intestinal, incluindo contagem de leucócitos, estado ácido-básico, eletrólitos ou enzimas. Porém, nenhum deles foi adotado na rotina da prática clínica.⁽³⁶⁾

O uso da amônia como indicador precoce de isquemia intestinal foi avaliado em um modelo canino de oclusão da AMS. Neste estudo as concentrações de amônia no plasma e líquido ascítico aumentaram precoce e significativamente nos animais submetidos à oclusão vascular em comparação com o grupo controle.⁽²²⁾ Mas, acreditamos que o fato de que níveis séricos de amônia podem estar alterados em decorrência de distúrbios do metabolismo, insuficiência hepática e até do uso de determinados medicamentos, pode ser

um fator limitante de seu uso como marcador de isquemia.

Vários autores relataram a Álcool Desidrogenase (ADH) como um potencial indicador de isquemia intestinal. Em um modelo de oclusão da AMS em ratos, as concentrações de ADH no sangue da veia porta (VP), no ventrículo direito (VD), na parte dorsal da aorta e na veia cava inferior (VCI) foram significativamente mais elevadas em animais com isquemia intestinal. A avaliação simultânea de níveis de Transaminase Glutâmico-Oxaloacética e Transaminase Glutâmico-Pirúvica, no sangue da VP e do VD, permitiram concluir que a origem do ADH é o intestino isquêmico e não o fígado, sugerindo a possibilidade da utilização da medida sérica de ADH como marcador de isquemia intestinal o que deve ser testado em estudos clínicos.⁽²³⁾

O nível sangüíneo de dímero D como um marcador potencial para isquemia mesentérica foi investigado em ratos. Os níveis de dímero D e lactato-L iniciais foram avaliados em animais controle e durante a ligadura da AMS. Porém, os resultados não sustentam o uso do nível sangüíneo de dímero D como um parâmetro isolado no diagnóstico da isquemia mesentérica, devido à trombose arterial. Os autores sugerem que esse parâmetro possa ser usado em conjunto com outros testes na eliminação da possibilidade de um evento tromboembólico.⁽³⁷⁾

Outro marcador de isquemia mesentérica descrito é o fosfato sérico. Concentrações de fosfato inorgânico aumentam nos líquidos corporais após infarto intestinal. A elevação da razão de depuração do fosfato, dos níveis de fosfato líquido sérico ou peritoneal em cães com função renal normal ocorre após a oclusão da AMS.⁽²⁴⁾ Contudo, distúrbios da função renal determinam

alterações nos níveis de fosfato sérico na ausência de isquemia intestinal.

Outros marcadores avaliados como a desidrogenase láctica (DHL), amilase, fosfatase alcalina e creatinofosfoquinase (CPK) não possuem especificidade para isquemia mesentérica.⁽³⁶⁾ O aumento da concentração de tirosina no perfusado intestinal, sem elevação concomitante dos seus níveis séricos, sugere liberação regional do aminoácido e uma possível maior especificidade que deve ser avaliada em testes clínicos.

Os mecanismos fisiopatológicos da liberação de tirosina durante a isquemia devem ser investigados em outros estudos, mas algumas possibilidades são discutidas.

A lesão da túnica mucosa do TGI desenvolve-se rapidamente durante a isquemia.⁽³⁵⁾ Ao microscópio óptico, detecta-se uma lesão morfológica com perda quase total do revestimento viloso epitelial após apenas 20 minutos de isquemia intestinal ou após 1 a 2 horas de choque. Durante a isquemia, como mecanismo compensatório o consumo de O_2 (VO_2) intestinal é mantido no limite inferior da normalidade pelo aumento da taxa de extração de O_2 (TeO_2).⁽³⁸⁾ Sinais de disfunção, isto é, redução do pH intramucoso (pHi) seguido de aumento da permeabilidade da túnica mucosa do intestino, precedem o aparecimento de alterações morfológicas na túnica mucosa do intestino.^(11,38)

A isquemia e a hipóxia tecidual induzem degradação de proteínas presentes na camada epitelial e nas túnicas *mucosa* e *muscular* da parede intestinal, provavelmente pela lesão oxidativa, desencadeando mecanismos proteolíticos e determinando a liberação de tirosina livre no lúmen intestinal. Visto que o tecido não sintetiza nem decompõe esse aminoácido, a liberação

da tirosina no lúmen intestinal reflete a decomposição efetiva das proteínas.

As células possuem diversas vias proteolíticas que podem ser ativadas ou inibidas de acordo com as suas necessidades. Em estados fisiologicamente alterados ou mesmo em diversas patologias, ocorre a ativação de diferentes vias conforme a condição e o órgão em questão. Essas mudanças são induzidas por alterações dos níveis de diversos hormônios. As vias proteolíticas conhecidas são: proteólise lisossomal, proteólise dependente de cálcio e proteólise dependente de ATP e Ubiquitina.⁽³⁹⁾

No interior do lisossoma, foram identificadas diversas enzimas proteolíticas, tais como catepsinas, e outras, às quais se atribui a degradação de proteínas de meia-vida longa, de receptores de membrana e de diversas outras proteínas em condições de privação nutricional. Essa proteólise ocorre através de processos não seletivos, como a macroautofagia (fusão de lisossomas com vacúolos originários do Golgi e do retículo endoplasmático liso) e a microautofagia (invaginação da superfície lisossomal que leva à produção de vesículas cujo conteúdo protéico sofre degradação no interior do lisossoma). Neste processo, as proteínas se ligam à proteína constitutiva de choque térmico formando um complexo, que então se liga a um receptor na membrana lisossomal, permitindo que sejam degradadas pelas proteases lisossomais.⁽³⁹⁾

O sistema proteolítico dependente de cálcio utiliza as calpaínas, que são cisteíno-proteases, existentes nos tecidos em três formas que diferem quanto à necessidade de cálcio para a sua atividade: a calpaína I, a calpaína II e a n-calpaína. Estas últimas parecem estar envolvidas no controle de proteínas regulatórias de vida curta e de fatores de transcrição. Já as calpaínas I e II

parecem estar envolvidas, preferencialmente, no controle dos níveis de outras proteínas constituintes de vias metabólicas ou de transdução de sinal. No músculo causam uma proteólise limitada das miofibrilas, podendo estar envolvidas em uma etapa inicial de sua degradação bem como no rearranjo da matriz do citoesqueleto.⁽³⁹⁻⁴¹⁾

O sistema proteolítico dependente de ATP e ubiquitina é uma via proteolítica de fundamental importância para a viabilidade celular. É formado por uma protease de peso molecular entre 1000 a 1500 kDa, e com um coeficiente de sedimentação de 26S, daí ter surgido a sua denominação mais aceita atualmente: proteassoma 26S. Este, por sua vez, é formado por um núcleo catalítico denominado proteassoma 20S e uma porção 19S na qual se localizam ATPases responsáveis pelo desenovelamento das proteínas a serem degradadas. Além disso, em algumas de suas subunidades ocorre a ligação das cadeias de poli-ubiquitina, que marca a proteína ao qual está ligada para a degradação. A ubiquitina é uma proteína de 76 resíduos de aminoácido, peso molecular 8500 Da. A marcação dos substratos a serem degradados ocorre através de uma cascata multi-enzimática nas quais enzimas se ligam à ubiquitina por meio de ligações tiol-ésteres. A via dependente de ATP e ubiquitina atua na degradação de proteínas anormais oriundas de mutações, erros biossintéticos ou danos causados por agentes físicos e químicos. É também responsável pela degradação de proteínas miofibrilares e pela renovação de proteínas de vida longa ou curta. É a via mais provável durante a lesão induzida pela isquemia.⁽³⁹⁻⁴¹⁾ As vias proteolíticas associadas à lesão do TGI induzida pela isquemia e possíveis moduladores devem ser motivo de

estudos futuros.

O balanço protéico de determinados tecidos pode ser avaliado quantificando-se as taxas de síntese e de degradação protéicas, em diferentes situações catabólicas.⁽⁴²⁾ Este balanço determina as alterações nas concentrações de aminoácidos em diferentes células ou tecidos. As taxas de síntese protéica podem ser avaliadas por técnicas de incorporação de aminoácidos marcados com radioisótopos. As dosagens de 3-MH ou de tirosina liberadas em meios de incubação ou no interstício são alguns dos métodos tradicionalmente utilizados para avaliar a taxa de degradação protéica.

A mensuração da 3-MH urinária é freqüentemente utilizada em estudos clínicos e experimentais. Ela representa a degradação das proteínas miofibrilares, portanto a actina e miosina. Contudo este método não é capaz de indicar o local da degradação protéica bem como a degradação de outras proteínas estruturais que não as musculares.⁽⁴³⁾

Em contraste a medida da taxa de liberação de tirosina reflete a degradação de todas as classes de proteínas e não distingue entre as proteínas miofibrilares e não-miofibrilares. A túnica serosa do intestino é composta de músculo liso e contém proteínas miofibrilares. As camadas epiteliais e a túnica serosa não contêm proteínas miofibrilares.

No presente modelo de isquemia mesentérica, observamos lesão tecidual grave demonstrada pelo estudo histológico como exposição da lâmina própria da mucosa por intensa destruição das vilosidades intestinais. Considerando-se que, se presente neste curto período de estudo, a síntese protéica foi similar nos dois grupos, a tirosina liberada no perfusado luminal intestinal reflete a

degradação local de proteínas estruturais e de enzimas da parede intestinal. Em decorrência destes achados concluímos que a mensuração da tirosina no lúmen intestinal pode ser utilizada como marcador de lesão tecidual decorrente de isquemia.

O presente estudo apresenta algumas limitações. Deve-se considerar a possibilidade de que a técnica utilizada para isolar um segmento fechado do intestino com a insuflação dos balões, no lúmen intestinal, pode ter provocado lesões secundárias à isquemia ou pressão. Contudo, uma vez que as lesões histológicas não apareceram nos animais do grupo controle deste estudo, postulamos que o perfusado luminal não afetou a mucosa intestinal.⁽²⁵⁾

Outro dilema será a obtenção de amostras em seres humanos com suspeita de isquemia mesentérica. A análise das concentrações de tirosina em amostras de lavado abdominal é uma possibilidade a ser avaliada em pacientes com sinais de peritonite. Outra possibilidade a ser investigada é a avaliação seqüencial dos níveis de tirosina em amostras de fluido luminal intestinal obtidas de sondas nasoentéricas. É necessário ainda avaliar a possibilidade de níveis sanguíneos elevados de tirosina em períodos mais longos de observação do que o usado no presente estudo.

5. CONCLUSÃO

5. CONCLUSÃO

O fluxo da tirosina proveniente do compartimento intracelular para o lúmen intestinal ocorreu nesse modelo, sugerindo uma proteólise derivada da isquemia intestinal, e um papel potencial para a tirosina como um marcador da lesão celular.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas

1. Biondo-Simões MLP, Greca FH, Ioshi S, Landmann FLS, Mandelli FL, Malayer GAA, et al. A antibioticoterapia prévia sobre o infiltrado inflamatório pulmonar após isquemia e reperfusão intestinal: estudo experimental em ratos. *Acta Cir Bras* 2000;15(supl. 3):47-52.
2. Martinez JP, Hogan GJ. Mesenteric ischemia. *Emerg Med Clin North Am* 2004;22(4):909-28.
3. Gonçalves WM, Krueel NF, Araújo PA, Franzon O. Isquemia mesentérica. *Rev On-line Assoc Catarinense Med* 1997;26(1):86-90.
4. Pinto Jr PE. Isquemia intestinal insuficiência vascular mesentérica. In: Pinotti HW, editor. *Tratado de clínica cirúrgica do aparelho digestivo*. São Paulo: Atheneu; 1994. p.702-11.
5. Silva E. Perfusão esplâncnica e disfunção gastrintestinal. In: Silva E, Friedman G, editores. *Sepse*. 4ª ed. São Paulo: Atheneu; 1999. p.171-95.
6. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992;72:65-83.
7. Parks DA, Bulkley DN, Granger DN, Hamilton SR, McCord JM. Ischemic injury to the cat small intestine: role of superoxide radicals. *Gastroenterology* 1982;82:9-15.

8. Parks DA, Granger N. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986;250:G749-753.
9. Koike K, Moore EE, Moore FA, Franciose RJ, Fontes B, Kim FJ. CD1 Blockade prevents lung injury despite neutrophil priming after gut ischemia/reperfusion. *J Trauma* 1995;39:23-7.
10. Weiss RL, Sisley AC, Harig JM. Neutrophil depletion attenuates human intestinal reperfusion injury. *J Surg Res* 1989; 57:192-7.
11. Brinkmann A, Calzia E, Trager K, Radermacher P. Monitoring the hepatosplanchnic region in the critically ill patient. Measurement techniques and clinical relevance. *Intensive Care Med* 1998;24:542-56.
12. Edward MS, Cherr GS, Craven TE, Olsen AW, Plonk GW, Geary RL, et al. Acute occlusive mesenteric ischemia: surgical management and outcomes. *Ann Vasc Surg* 2003;17(1):72-9.
13. Santos CHM, Gomes OM, Pontes JCDV, Mijji LNO, Higa EI. Use of propofol (2,6 diisopropilphenol) as inhibitor of tissue lesion in mesenteric ischemia and reperfusion: experimental study in rats. *Acta Cir Bras* 2003; 18(4):347-54.
14. Horgan PG, Gorey TF. Operative assessment of intestinal viability. *Surg Clin North Am* 1992;1:141-53.

15. Mark LA, Robinson AV, Schulak JA. Inhibition of Nitric Oxide Synthase Reduces Renal Ischemia/Reperfusion Injury. *J Surg Res* 2005 Sep 1;[Epub ahead of print].
16. Weihrauch D, Krolikowski JG, Bienengraeber M, Kersten JR, Warltier DC, Pagel PS. Morphine enhances isoflurane-induced postconditioning against myocardial infarction: the role of phosphatidylinositol-3-kinase and opioid receptors in rabbits. *Anesth Analg* 2005;101(4):942-9.
17. Morariu AM, Loef BG, Aarts LP, Rietman GW, Rakhorst G, van Oeveren W et al. Dexamethasone: benefit and prejudice for patients undergoing on-pump coronary artery bypass grafting: a study on myocardial, pulmonary, renal, intestinal, and hepatic injury. *Chest* 2005 Oct.;128(4):2677-87.
18. Hiratsuka T, Futagami S, Tatsuguchi A, Suzuki K, Shinji Y, Kusunoki M, et al. COX-1 and COX-2 conversely promote and suppress ischemia-reperfusion gastric injury in mice. *Scand J Gastroenterol* 2005;40(8):903-13.
19. Savassi-Rocha PR. Métodos de avaliação da viabilidade intestinal. In: Rasslan S, editor. *Afecções cirúrgicas de urgência*. São Paulo: Robe; 1995. p.186.
20. Sheridan WG, Lowndes RH, Willians GT, Young HL. Determination of a critical level of tissue oxygenation in acute intestinal ischemia. *Gut*

- 1992;33:762-6.
21. Esteves FP, Caravatto PPP, Yamakami LYS, Araújo SEA, Genzini T, Perosa M. Avaliação perioperatória da viabilidade intestinal. *Rev Med (São Paulo)* 2003;82(1-4):46-57.
 22. Watari M, Murakami H, Orihashi K, Sueda T, Matsuura Y, Kayihara H. Ammonia determination as an early indicator in experimental superior mesenteric artery occlusion. *Hiroshima J Med Sci* 1997;46(4):159-67.
 23. Gumaste UR, Joshi MM, Mourya DT, Barde PV, Shrivastav GK, Ghole VS. Alcohol dehydrogenase: a potential new marker for diagnosis of intestinal ischemia using rat as a model. *World J Gastroenterol* 2005;11(6):912-6.
 24. Jamieson WG, Taylor BM, Troster M, Durand D. The significance of urine phosphate measurements in the early diagnosis of intestinal infarction. *Surg Gynecol Obstet* 1979;148(3):334-8.
 25. Lobo SMA. Fatores envolvidos na gênese da lesão da mucosa intestinal no choque endotóxico [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2002.
 26. Tonnessen TI. Biological basis for PCO₂ as a detector of ischemia. *Acta Anaesthesiol Scand* 1997;41:659-69.

27. Vincent JL. The available clinical tools. Oxygen derived variables, lactate, and pHi. In: Vincent JL, editor. Tissue oxygenation in acute medicine. 1^a ed. Germany: Springer; 2002. p.193-203.
28. Friedman G, Berlot G, Kahn RJ, Vincent JL. Combined measurements of blood lactate concentrations and gastric intramucosal pH in patients with severe sepsis. *Crit Care Med* 1995;23:1184-93.
29. Zamir O, Hasselgren PO, Higashiguchi T, Frederick JA, Fischer JE. Tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) induce muscle proteolysis through different mechanisms. *Mediat Inflamm* 1992;1:247-50.
30. Creteur J, De Backer D, Vincent JL. Monitoring gastric mucosal carbon dioxide pressure using gas tonometry. *Anesthesiology*. 1997 Sep;87(3):504-10.
31. Waalkes TP, Udenfriend S. A fluorometric method for the estimation of tyrosine in plasma and tissues. *J Lab Clin Med* 1957; 50:733-6.
32. Goodman MN, McElaney MA, Ruderman NB. Adaptation to prolonged starvation in the rat: curtailment of skeletal muscle proteolysis. *Am J Physiol* 1981;241:E321-E327.
33. Clark AS, Mitch WE. Comparison of protein synthesis and degradation in incubated and perfused muscle. *Biochem J* 1983;212:649-53.

34. Navegantes LCC, Resano NMZ, Migliorini RH, Kettelhut IC. Effect of guanethidine-induced adrenergic blockade on the different proteolytic systems in rat skeletal muscle. *AJP – Endo* 1999;277:883-9.
35. Chiu CJ, Mcardle AH, Brown R. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. A morphological, hemodynamic, and metabolic reappraisal. *Arch Surg* 1997;101:478-83.
36. Baixauli J, Kiran RP, Delaney CP. Investigation and management of ischemic colitis. *Cleveland Clinic J Med* 2003;70:920-34.
37. Kulacoglu H, Kocaerkek Z, Moran M, Kulah B, Atay C, Kulacoglu S, *et al.* Diagnostic value of blood D-dimer level in acute mesenteric ischaemia in the rat: an experimental study. *Asian J Surg* 2005;28(2):131-5.
38. Morini S, Yacoub W, Rastellini C, Gaudio E, Watkins SC, Cicalese L. Intestinal microvascular patterns during hemorrhagic shock. *Dig Dis Sci* 2000;45:710-22.
39. Galban VD, Kettelhut IC. Mecanismo de proteólise e seus fundamentos. [citado 2005 Mar 10]. Disponível em: URL: <http://www.rbi.fmrp.usp.br/proteol/proteol.htm>
40. Dayton WR, Goll DE, Zeece MG, Robson ZRM, Reville WJ. A Ca²⁺ - activated protease possible involved in myofibrillar protein turnover.

Purification from porcine muscle. *Biochemistry* 1976;15(10):2150-8.

41. Hochstrasser M. Ubiquitin-dependent protein degradation *Ann Rev Genet* 1996;30:405-39.
42. Garlick PJ, McNurlan MA, Essen P, Wernerman J. Measurement of tissue protein synthesis rates *in vivo*: a critical analysis of contrasting methods. *Am J Physiol* 1994;266:287-97.
43. Asatoor AM, Armstrong MD. 3-Methylhistidine, a component of actin. *Biochem Biophys Res Commun* 1967;26:168-74.