

JOSÉ DE SOUZA NEVES

**EFEITOS DO PRECONDICIONAMENTO ISQUÊMICO
ASSOCIADO A DIFERENTES SOLUÇÕES DE
PRESERVAÇÃO, NO INTESTINO DELGADO
PRESERVADO HIPOTERMICAMENTE**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em
Ciências.**

São Paulo
2011

JOSÉ DE SOUZA NEVES

**EFEITOS DO PRECONDICIONAMENTO ISQUÊMICO
ASSOCIADO A DIFERENTES SOLUÇÕES DE
PRESERVAÇÃO, NO INTESTINO DELGADO
PRESERVADO HIPOTERMICAMENTE**

**Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola
Paulista de Medicina, para obtenção
do Título de Doutor em Ciências
pelo Programa de Pós-Graduação
em Gastroenterologia Cirúrgica.**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Adriano Miziara Gonzalez

CO-ORIENTADORA: Prof^a Dr^a. Edna Frasson de Souza Montero

Neves, José de Souza

EFEITOS DO PRECONDICIONAMENTO ISQUÊMICO ASSOCIADO A DIFERENTES SOLUÇÕES DE PRESERVAÇÃO, NO INTESTINO DELGADO PRESERVADO HIPOTERMICAMENTE

Effects of ischemic preconditioning associated with different preservation solutions, in the small bowel preserved under hypothermia

São Paulo, 2011.
107 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Gastroenterologia Cirúrgica.

1.Solução de preservação; 2.Precondicionamento isquêmico; 3.Celsior; 4. Custodiol; 5.Belzer; 6. Estudo experimental; 7.Preservação intestinal



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE GASTROENTEROLOGIA**

Chefe do Departamento: Prof^a Dr^a Lydia Masako Ferreira
Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. Delcio Matos

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA/UNIFESP-EPM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GASTROCIRURGIA**

COORDENADOR: Prof. Dr. Delcio Matos

TESE DE DOUTORADO

AUTOR: José de Souza Neves

ORIENTADOR: Prof. Dr. Adriano Miziara Gonzalez

CO-ORIENTADORA: Prof^a Dr^a Edna Frasson de Souza Montero

**TÍTULO: Efeitos do condicionamento isquêmico associado a
diferentes soluções de preservação, no intestino delgado
preservado hipotermicamente**

BANCA EXAMINADORA:

MEMBROS EFETIVOS:

- 1 - Prof. Dr. Adriano Miziara Gonzalez
- 2 - Prof. Dr. Flavio Henrique Ferreira Galvão
- 3 - Prof. Dr. Murched Omar Taha
- 4 - Prof. Dr. Cervantes Caporossi
- 5 - Prof. Dr. Alcides Augusto Salzedas Netto

MEMBROS SUPLENTE:

- 1 - Prof. Dr. Marcelo Moura Linhares
- 2 - Prof. Dr. André Ibrahim David

Dedicatória

*Este estudo é dedicado a Sr^a **MARIA SIMPLICIA DA PAIXÃO NEVES** (Dona Cici), nascida em 1926, na cidade de Chapada dos Guimarães, Mato Grosso. Esta Senhora aprendeu a ler e a escrever aos 14 anos, casou-se aos 18, ficou viúva aos 30 e, daí em diante, dedicou-se ao trabalho e à educação integral dos 7 filhos. Sua maior qualidade, dentre tantas, é a inigualável capacidade de saber “dosar” as coisas. Nunca passa da medida, nem para mais, nem para menos. Assim é na razão, na emoção, nos conselhos, nos negócios, no afeto, na argumentação, etc. Hoje, jovem aos 85 anos, do alto dos seus 1,57m, se posta, com absoluto equilíbrio, diante dos erros e acertos da modernidade. É um privilégio tê-la por perto.*

e

*Ao Sr. **JOSÉ DE SOUZA NEVES** (in memorian) que, acredito, tem me protegido e ajudado bastante nos momentos difíceis, de reflexão e de tomada de decisões.*

AOS

Isabel Cristina Melón de Souza Neves

*“Que tem sido, há anos, meu “braço direito”; aliás... o esquerdo também.
Não sei como seria a caminhada sem a sua companhia.
Não sei se teria “pernas”.*

Renato Melón de Souza Neves

*A minha maior alegria é vê-lo saudável e feliz.
Que Deus o conserve assim.*

HOMENAGEM

**AO PROFESSOR MASAYUKI OKUMURA, PIONEIRO NA REALIZAÇÃO DE
TRANSPLANTE INTESTINAL**



Fórum Internacional de Transplantes do Aparelho Digestivo (FITx 2010), São Paulo/SP
10/12/2010

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTO ESPECIAL

AO PROFESSOR DR. ADRIANO MIZIARA GONZALEZ

Por ter aceitado, prontamente, desde o primeiro contato via *e-mail*, ser orientador desta tese. A partir de então, direcionou o andamento dos trabalhos com objetividade (própria de um cirurgião), simplicidade e humildade, sempre discutindo democraticamente as decisões a serem tomadas. Expresso minha profunda gratidão.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À PROFESSORA DR^a EDNA FRASSON DE SOUZA MONTERO

Pela generosa disponibilidade de ter aceitado co-orientar este estudo. Agradeço, também, por permitir o acesso ao Laboratório de Microcirurgia Experimental da UNIFESP, para todos os procedimentos necessários à implementação do estudo-piloto; pela coordenação do estudo-piloto e pela ativa participação nas decisões tomadas quanto ao andamento da pesquisa em conjunto com o orientador.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

AO PROFESSOR DR. DELCIO MATTOS

Coordenador deste Programa de Pós-Graduação, pela confiança depositada desde o início das minhas atividades nesta Instituição, pela oportunidade concedida de participar do Programa de Doutorado e pelos ensinamentos científicos expressos no decorrer dos módulos mensais.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **PROFESSORA DR^a CELINA TIZUKO FUJIYAMA OSHIMA** e a toda a Equipe do Serviço de Patologia: **PROFESSORA LARISSA COMPARINI DA SILVA**, **PROFESSOR DR. DANIEL RIBEIRO ARAKI**, pelo tratamento, extremamente agradável e cortês a mim dispensado, e pela disponibilidade de participação no preparo do material para análise imunohistoquímica, fundamental para este experimento.

À **PROFESSORA DR^A NAIR HONDA KAWASHITA** e seus alunos, **DAMIANA LUIZA PEREIRA DE SOUZA** e **GUSTAVO MITZUO AIKO**, da Faculdade de Química da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), pela realização da dosagem do Acido Malondialdeído (MDA).

AO **PROFESSOR MARCOS DE SOUZA ABRAHÃO**, doutorando em Cirurgia e Experimentação/Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UNIFESP, pela participação no estudo-piloto e pela contribuição nas análises iniciais dos graus de lesão da mucosa intestinal.

AO **PROFESSOR DR. AMILCAR SABINO DAMAZO**, Coordenador de Programas de Pós-Graduação em Medicina da Faculdade de Ciências Médicas e Professor do Departamento de Histologia da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), pela colaboração na leitura (informatizada) das lâminas e contagem da apoptose.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À **ISABEL CRISTINA MELÓN DE SOUZA NEVES**, Companheira em tempo integral há mais de vinte anos; incondicionalmente solidária e cúmplice em todos os momentos importantes da minha vida. Agradeço pelo carinho, dedicação, disposição e pela contribuição, em todas as fases da execução deste projeto.

AGRADECIMENTOS

À **UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**, pela recepção como aluno, possibilitando minha titulação.

Aos **PROFESSORES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GASTROCIRURGIA da UNIFESP-EPM**, pelos ensinamentos, críticas, incentivo e pelo exemplo como Docentes e Pesquisadores.

À **UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO (UFMT)** por me franquear a oportunidade de realizar esta Pós-Graduação.

À **PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO (PROPG/UFMT)** pela concessão do afastamento parcial das atividades docentes para o desenvolvimento desta Pós-Graduação.

Ao Chefe do Departamento de Clínica-Cirúrgica da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), **PROFESSOR FERNANDO ARRUDA**.

Ao amigo **DR. GILMAR FERREIRA DO ESPIRITO SANTO**, Professor-Mestre da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT) e Universidade de Cuiabá (UNIC); colega Mato-Grossense, participante desta venturosa jornada de estudos.

Às **FUNCIONÁRIAS DO LABORATÓRIO DE PATOLOGIA DO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JÚLIO MÜLLER, DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO (UFMT)**, pelo preparo dos blocos de parafina e das lâminas (H-E), para avaliação dos graus de lesão da mucosa.

Aos Técnicos do Laboratório de Investigação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), **VALTER GONÇALVES e NILSON BOTELHO**, pelos controles e cuidados com os animais. Devo denunciar que os defeitos mais graves dos dois são ser torcedores do Flamengo e Palmeiras, respectivamente, o que motivou fortes polêmicas nos intervalos das realizações dos procedimentos cirúrgicos.

À Residente de Cirurgia-Geral, **Dra MICHELLI DALTRO**, do Hospital Universitário Júlio Müller da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), pelo auxílio na execução dos procedimentos cirúrgicos.

À **PROFESSORA DR^a CAROLINE PESCADOR**, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), pela participação no estudo morfológico.

Aos **FUNCIONÁRIOS DA DISCIPLINA DE GASTROENTEROLOGIA CIRÚRGICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP)**, pela presteza, carinho e educação com os alunos da pós-graduação.

Aos **COLEGAS DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO (UNIFESP)**, pela amizade, críticas e sugestões, quanto à execução deste projeto.

AOS COLEGAS PROFESSORES DO DEPARTAMENTO DE CLÍNICA CIRÚRGICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO (UFMT), pelo apoio incondicional e incentivo para conclusão da Pós-Graduação.

À Coordenadora de Regulação da Secretaria de Saúde do Estado de Mato Grosso, **IVANA MARA M. MELLO** e ao Secretário-Adjunto de Saúde do Estado de Mato Grosso **Dr VANDER FERNANDES**, pelo apoio institucional e liberação das minhas atividades, durante a realização dos módulos (créditos) da Pós-Graduação.

À Gerente de Desenvolvimento e Valorização do Servidor da Secretaria de Saúde do Estado de Mato Grosso, **SILVIA APARECIDA TOMAZ** e **DEMAIS FUNCIONÁRIOS DA SECRETARIA ESTADUAL DE SAÚDE** pelo tratamento eficiente, gentil e cortês, nos momentos em que lá estive.

Ao meu filho, **RENATO MELÓN DE SOUZA NEVES**, acadêmico da Faculdade de Direito da Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), por algumas sugestões gramaticais e, sobretudo, pela agradável companhia.

A minha Cara Madrinha **BENEDITA DJALME DA PAIXÃO** (*in memorian*) que, acredito, assim como meu pai, tem me protegido e ajudado bastante nos momentos difíceis, de reflexão e de tomada de decisões.

Aos meus irmãos e irmãs, **JOÃO, JOEL, GONÇALO, BELINE, CECÍLIA E RAQUEL**, pela convivência, apoio, estímulo e compreensão quanto às minhas ausências.

Aos **ALUNOS DE MEDICINA DA UFMT** por, indiretamente, fazer despertar esse sentimento da necessidade de capacitação científica.

Aos **NOVOS AMIGOS DO GRUPO DE TRANSPLANTES** da UNIFESP-EPM, pela receptividade e agradável convivência: **Dr. Adriano Miziara Gonzalez, Dr. Alcides Augusto Salzedas Netto, Dr. Marcelo Moura Linhares, Dr. Alexandre Alberto Barros Duarte, Dr. Edmond Le Campion, Dr. Fernando Pompeu Piza Vicentine, Dr. Rogério Aoki Fuziy, Dr. Rogério Perez e Felipe Leite.**

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xiv
LISTA DE TABELAS.....	xvi
LISTA DE GRÁFICOS.....	xviii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xix
RESUMO.....	xx
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	09
3. MÉTODO.....	10
3.01 Delineamento experimental	10
3.02 Animais	10
3.03 Grupos	11
3.04 Soluções de Preservação	12
3.05 Procedimento anestésico	13
3.06 Procedimento operatório	14
3.07 Infusão das Soluções de Preservação	16
3.08 Sacrifício	17
3.09 Coleta do segmento intestinal para preservação	18
3.10 Coleta de amostras intestinais para estudo	18
3.11 Preparo das amostras e dosagem do MDA	19
3.12 Preparo das amostras para estudo morfológico	19

3.13 Preparo das amostras para estudo imunohistoquímico	20
3.14 Análise estatística	22
4. RESULTADOS.....	24
4.01 MDA	24
4.02 Graus de lesão da mucosa	28
4.03 Apoptose nas vilosidades intestinais	31
5. DISCUSSÃO.....	41
5.01 Aspectos gerais	41
5.02 Discussão do Método	45
5.03 Discussão dos Resultados	51
6. CONCLUSÕES.....	58
7. ANEXOS.....	59
7.01 Resultados gerais da dosagem do MDA	59
7.02 Resultados gerais da análise dos graus de lesão da mucosa intestinal	63
7.03 Resultados gerais das análises da apoptose nas vilosidades intestinais	64
8. REFERÊNCIAS.....	68
9. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	84
10. ABSTRACT.....	85

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 01 Grupos	12
Figura 02 Abertura da cavidade	14
Figura 03 Exposição intestinal	14
Figura 04 Isolamento de segmento ileal para preservação	15
Figura 05 Períodos observados durante os procedimentos	16
Figura 06 Isquemia (PCI)	16
Figura 07 Reperusão (PCI)	16
Figura 08 Cenário de realização dos procedimentos	17
Figura 09 Alça intestinal após infusão da solução de preservação	17
Figura 10 Sistema informatizado para quantificação celular por imunohistoquímica	22
Figura 11 Sistema informatizado para quantificação celular por imunohistoquímica (imagem em maior detalhe)	22
Figura 12 Lesão grau 1	36
Figura 13 Lesão grau 2	36
Figura 14 Lesão grau 3	36
Figura 15 Lesão grau 4	37
Figura 16 Lesão grau 5	37
Figura 17 Lesão grau 6	37
Figura 18 Apoptose nos vilos, Grupo RL, zero hora de preservação	38
Figura 19 Apoptose nos vilos, Grupo Celsior, 12 horas de preservação com PCI	38

Figura 20 Apoptose nos vilos, Grupo Belzer, 18 horas de preservação com PCI	39
Figura 21 Apoptose nos vilos, Grupo Custodiol, 24 horas de preservação com PCI	39
Figura 22 Apoptose nos vilos, Grupo RL, 18 horas de preservação sem PCI	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 Peso dos animais nos quatro grupos	11
Tabela 02 Componentes das Soluções de Preservação	13
Tabela 03 Escore de injúria na mucosa intestinal	20
Tabela 04 Média e desvio-padrão do valores do MDA em nmol/mg de tecido nos Grupos Ringer, Celsior, Custodiol e Belzer, sem preconditionamento isquêmico, com zero, 12, 18 e 24 horas de preservação	25
Tabela 05 Média e desvio-padrão do valores do MDA em nmol/mg de tecido nos Grupos Ringer, Celsior, Custodiol e Belzer, com preconditionamento isquêmico, com zero, 12, 18 e 24 horas de preservação	26
Tabela 06 Média, desvio-padrão e mediana dos graus de lesão da mucosa com zero, 12, 18 e 24 horas de preservação, respectivamente, nos Grupos Ringer, Celsior, Custodiol e Belzer, sem e com preconditionamento isquêmico	29
Tabela 07 Média e desvio-padrão do percentual de células em apoptose nos Grupos Ringer, Celsior, Custodiol e Belzer, sem preconditionamento isquêmico, com zero, 12, 18 e 24 horas de preservação	32
Tabela 08 Média e desvio-padrão do percentual de células em apoptose nos Grupos Ringer, Celsior, Custodiol e Belzer, com preconditionamento isquêmico, com zero, 12, 18 e 24 horas de preservação	33
Tabela 09 Resultados da dosagem do MDA em nmol/mg de tecido no Grupo Ringer, sem e com preconditionamento isquêmico nos sete animais, com zero, 12, 18 e 24 horas de preservação	59
Tabela 10 Resultados da dosagem do MDA em nmol/mg de tecido no Grupo Celsior, sem e com preconditionamento isquêmico nos sete animais com zero, 12, 18 e 24 horas de preservação	60
Tabela 11 Resultados da dosagem do MDA em nmol/mg de tecido no Grupo Custodiol, sem e com preconditionamento isquêmico nos sete animais com zero, 12, 18 e 24 horas de preservação	61
Tabela 12 Resultados da dosagem do MDA em nmol/mg de tecido no Grupo Belzer, sem e com preconditionamento isquêmico nos sete animais com zero, 12, 18 e 24 horas de preservação	62
Tabela 13 Grau de lesão da mucosa nos Grupos Ringer, Celsior, Custodiol e Belzer sem e com preconditionamento isquêmico	63

Tabela 14 Resultados da quantificação percentual do índice de apoptose celular nas vilosidades intestinais no Grupo Ringer, sem e com condicionamento	64
Tabela 15 Resultados da quantificação percentual do índice de apoptose celular nas vilosidades intestinais no Grupo Celsor, sem e com condicionamento	65
Tabela 16 Resultados da quantificação percentual do índice de apoptose celular nas vilosidades intestinais no Grupo Custodiol, sem e com condicionamento	66
Tabela 17 Resultados da quantificação percentual do índice de apoptose celular nas vilosidades intestinais no Grupo Belzer, sem e com condicionamento	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01 Valores do MDA em nmol/mg de tecido nos Grupos Ringer, Celsior, Custodiol e Belzer, sem preconditionamento isquêmico, com Zero, 12, 18 e 24 horas de preservação	27
Gráfico 02 Valores do MDA em nmol/mg de tecido nos Grupos Ringer, Celsior, Custodiol e Belzer, com preconditionamento isquêmico, com Zero, 12, 18 e 24 horas de preservação	28
Gráfico 03 Grau de lesão da mucosa nos Grupos Ringer, Celsior, Custodiol e Belzer, sem preconditionamento isquêmico, com Zero, 12, 18 e 24 horas de preservação	30
Gráfico 04 Grau de lesão da mucosa nos Grupos Ringer, Celsior, Custodiol e Belzer, com preconditionamento isquêmico, com Zero, 12, 18 e 24 horas de preservação	31
Gráfico 05 Valores percentuais do índice de apoptose nas vilosidades intestinais nos Grupos Ringer, Celsior, Custodiol e Belzer, sem preconditionamento isquêmico, com Zero, 12, 18 e 24 horas de preservação	34
Gráfico 06 Valores percentuais do índice de apoptose nas vilosidades intestinais nos Grupos Ringer, Celsior, Custodiol e Belzer, com preconditionamento isquêmico, com Zero, 12, 18 e 24 horas de preservação	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ATP = Adenosina Trifosfato

ATPase = Adenosina Trifosfatase

cm = centímetro

DAB = Cromógeno 3,3 Diaminobenzidine

EC = Solução de Euro-Collins

EROs = Espécies Reativas de Oxigênio

g = grama

HES=Hidroxi-Etil-Starch (amido)

H.E. = hematoxilina-eosina

H₂O₂ = peróxido de hidrogênio

I/R = Isquemia e Reperfusão

ICAM-1 = Molécula de Adesão Intercelular –1

kg = kilograma

L = litro

µm = micrômetro

mg = miligrama

mL = mililitro

mm = milímetro

N.S. = não significativa

NF-KB = fator nuclear kappa beta

NO = óxido nítrico

°C = graus Celsius

PCI = condicionamento isquêmico

PCNA = proliferating cell nuclear antigen = antígeno nuclear de proliferação celular

RL = Solução de Ringer-Lactato

TUNEL= terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate nick-end labeling

TNF= fator de necrose tumoral alfa

UNIFESP-EPM = Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina

UFMT = Universidade Federal de Mato Grosso

UW= Universidade de Wisconsin

RESUMO

INTRODUÇÃO: A preservação de enxertos intestinais é fator determinante para o sucesso dos transplantes de intestino delgado. **OBJETIVO:** Avaliar os efeitos do condicionamento isquêmico associado às Soluções de Belzer, Celsior, Custodiol e Ringer-Lactato na preservação intestinal e avaliar, também, qual destas soluções, isoladamente, tem melhor desempenho. **MÉTODO:** Foram formados, aleatoriamente, 4 grupos de 14 ratos Wistar, machos, com peso entre 250 e 300 gramas, sendo todos submetidos à laparotomia e coleta de 20 cm de íleo, para preservação, sob hipotermia, nas soluções Ringer (RL), Celsior (Cs), Custodiol (Cust) e Belzer (Belz), por um período de 24 horas. Previamente à coleta do segmento ileal, metade dos animais de cada grupo foi submetida ao condicionamento isquêmico do intestino delgado (PCI), que consistiu de oclusão da artéria mesentérica superior, por 10 minutos, seguido de liberação do fluxo (reperusão) pelo mesmo período. No decorrer do período de preservação, foram coletadas amostras intestinais em 4 momentos: com Zero, 12, 18 e 24 horas. Em cada um destes momentos foram realizadas: análise do grau de lesão da mucosa (escore de Park et al.); dosagem do ácido malondialdeído (MDA), em nmol/mg de tecido; quantificação da apoptose celular nas vilosidades intestinais através de estudo imunohistoquímico, com anticorpos anti-caspase 3. Os testes estatísticos usados foram: ANOVA, Tukey, Kruskal-Wallis e Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. **RESULTADOS:** Nos animais sem pci os valores do MDA, grau de lesão da mucosa e apoptose foram maiores nos grupos RL, e a apoptose celular foi menor nos grupos Cs e Belz ($p < 0,05$). Nos grupos com pci o RL apresentou maiores valores de MDA com 18 e 24h de preservação ($p < 0,05$). Os graus de lesão da mucosa e a apoptose, com exceção de zero h, foram maiores nos grupos RL e Cust e menores no Cs e Belz. **CONCLUSÃO:** As Soluções Celsior e Belzer tiveram melhores efeitos na proteção do intestino delgado e estes efeitos foram incrementados pelo PCI.

1. INTRODUÇÃO

O transplante de intestino delgado (TID) é o tratamento proposto para várias afecções intestinais⁽¹⁾, porém, apesar de importantes avanços, a preservação dos enxertos de intestino ainda representa um desafio^(2,3,4,5).

O TID é indicado, especialmente, para os pacientes que se submeteram à enterectomia extensa e evoluíram para insuficiência intestinal, decorrente da Síndrome do Intestino Curto⁽⁶⁾. Nesses casos, o fenômeno fisiopatológico da adaptação intestinal foi insuficiente para a recuperação da normalidade fisiológica do trato digestivo e o paciente, geralmente, fica dependente de nutrição parenteral (NP) para sua sobrevivência. A manutenção de pacientes com terapia nutricional venosa, por longos períodos, apresenta inúmeras complicações e a alternativa, nos casos em que não há condições de manutenção da NP, é o transplante^(7,8).

Historicamente, o primeiro transplante experimental foi descrito em 1902, por Alexis Carrel, em francês - *La technique des anastomoses vasculaires et la transplantation des viscères*. Em 1905, Carrel publicou um artigo, desta vez em linguagem anglo-saxônica, em que discorre sobre anastomoses vasculares e o transplante de órgãos⁽⁹⁾. É interessante lembrar e destacar que, por estes pioneiros estudos, Aléxis Carrel foi laureado com o prêmio Nobel de Medicina, em 1912⁽⁹⁾. Lillehei, Goot e Miller, em 1959, descreveram as bases técnicas e fisiopatológicas do TID experimental em cães⁽¹⁰⁾ e Monchic & Russel, em 1971, descreveram a técnica em ratos através de microcirurgia⁽¹¹⁾. No Brasil, Goffi, Fujimura, Tolosa, Lemos, Behmer, Freitas, Carnevale, e Nakashima, no início da década de 70, realizaram os primeiros estudos experimentais sobre o tema⁽¹²⁾.

Segundo Greenstein et al. a primeira tentativa de TID em humanos, realizada por Deterling em Boston no ano de 1964, não foi publicada⁽¹³⁾. O primeiro artigo, reportando clinicamente esse tipo de transplante, foi publicado por Lillehei et al., em 1967⁽¹⁴⁾, e até o ano de 1970, oito casos de transplante intestinal haviam sido publicados, com sobrevida máxima do enxerto de 79 dias e óbito de todos os pacientes. Portanto, as tentativas iniciais de TID, em humanos, não obtiveram êxito^(15,16,17) e os

insucessos foram atribuídos a questões técnicas, rejeição e dificuldades na preservação dos enxertos.

A segunda fase dos transplantes intestinais iniciou-se na década de 80 com o advento dos novos medicamentos imunossupressores: ciclosporina, em 1980⁽¹⁸⁾ e tacrolimus, em 1987⁽¹⁹⁾. No ano seguinte, Deltz et al. realizaram, em Kiel, Alemanha, o que se considera o primeiro caso de TID bem sucedido⁽²⁰⁾. Em seguida, outros TID com resultados considerados satisfatórios foram relatados^(20,21), porém, os autores destacaram, ainda, altas taxas de complicações^(22,23,24).

No Brasil, Okumura et al., em 1968, realizaram heroicamente o primeiro transplante intestinal. Naquela oportunidade não se dispunha ainda de medicamentos imunossupressores e outros avanços, como os de terapia intensiva e nutricionais para utilização no perioperatório. Iasi, Soler et al., no ano de 2000, já dispondo de imunossupressores e outros recursos, realizaram, na Santa Casa de São Paulo, o primeiro TID em paciente pediátrico, com sobrevida de 100 dias. No período de 2004 a 2008 mais três transplantes foram realizados, por Silva et al., no Hospital Universitário de São José do Rio Preto, São Paulo (SP). Os pacientes tiveram evolução desfavorável e as complicações foram relacionadas principalmente à rejeição, à sepse e a outros eventos clínicos⁽²²⁾.

Atualmente, o TID está tecnicamente bem estabelecido^(7,25,26), porém, os resultados ainda são inferiores aos de outros órgãos, tendo em vista que as taxas de mortalidade permanecem relativamente altas, em torno de 40%, aos cinco anos pós-transplante, de acordo com os registros internacionais^(1,2,13), enquanto que em outros transplantes do aparelho digestivo a sobrevida tem alcançado taxas de 80%. As complicações do TID, na maioria dos casos, estão relacionadas à rejeição e infecção, às lesões de isquemia e reperfusão (I/R), bem como à ocorrência de disfunção primária do enxerto, induzida pelas injúrias que ocorrem no período de preservação⁽⁵⁾.

A rejeição está relacionada à imunogenicidade do órgão, que possui maciça quantidade de tecido linfóide. As infecções são inerentes aos procedimentos cirúrgicos desta magnitude, tendo também, indiretamente, relação com os fenômenos imunológicos^(27,28,29).

As lesões de I/R são desencadeadas pela ativação e liberação local e sistêmica de radicais livres, no momento em que o intestino é reperfundido^(3,24). Essas lesões relacionadas à reperfusão têm sido objeto de vários estudos publicados na literatura e uma das opções que vem sendo alentadas, para diminuição dos seus efeitos lesivos, é a utilização de substâncias antioxidantes e de elementos nutricionais⁽³⁰⁾.

Em relação às “lesões de preservação”, tema-central da investigação no presente trabalho, são ocasionadas, basicamente, pela isquemia e pela hipotermia impostas ao órgão, no período entre a captação e o implante.

O intestino delgado é o órgão mais perfundido do organismo, recebendo em torno de 25% do sangue bombeado pelo coração, sendo que, desse montante, 90% são consumidos na mucosa e submucosa, que são as áreas mais precocemente atingidas pela isquemia. Ressalta-se, ainda, que este setor do trato digestivo possui alta taxa de regeneração celular, tornando-o altamente vulnerável a lesões durante a fase isquêmica do transplante. Apesar desse alto poder de regeneração, tem-se demonstrado que, para a recuperação morfológica, após 24h de injúria isquêmica da mucosa ileal, requer-se, pelo menos, trinta dias^(31,32,33).

A interrupção do aporte de oxigênio para o intestino leva à inibição da fosforilação oxidativa mitocondrial e à queda na produção e no estoque de adenosina trifosfato (ATP). Entretanto, o estoque de ATP continua sendo consumido e degradado à adenosina difosfato (ADP), à adenosina monofosfato e, posteriormente, à adenosina, inosina e hipoxantina^(34,35). Nestas circunstâncias, a falta de energia celular determina, além das alterações metabólicas, a falência da bomba de sódio-potássio, com acúmulo de sódio no meio intracelular e perda de potássio para fora da célula. Concomitantemente, ocorre influxo de cálcio e de cloreto para o meio intracelular, com acúmulo destes íons no citosol⁽³⁶⁾. Estas alterações, no transporte de íons, culminam com a lesão da membrana e dano irreversível à célula^(37,38,39,40).

A hipotermia, indispensável para a preservação, é outro fator que, paradoxalmente, determina desarranjo na fisiologia celular⁽⁴¹⁾. Os principais efeitos colaterais da hipotermia são: edema celular, devido ao agravamento da já prejudicada atividade da bomba de sódio; acidose, pela depleção do ATP

celular, metabolismo anaeróbico e formação de moléculas de ácido láctico; e geração exacerbada de radicais livres, como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), anion superóxido (O_2^-) e radical hidroxil ($-\text{OH}$), proporcionando danos as mitocondriais e a membrana celular⁽²³⁾.

Fundamentalmente, a preservação adequada depende de ações que se contraponham aos efeitos deletérios da isquemia e hipotermia.

A primeira tentativa de preservação de órgãos foi feita por Loebel, em 1849, através de perfusão vascular de fluidos por gravidade. Por volta de 1930, Carrel vislumbra e viabiliza a construção de um aparelho de perfusão automático⁽⁴²⁾, composto de metal e vidro; porém, as dificuldades na esterilização destes componentes impediram a sua utilização. Posteriormente, o aparelho foi aperfeiçoado e passou a ser utilizado⁽⁴²⁾; no entanto, a preservação estática hipotérmica ganhava espaço em função de sua maior praticidade e dos resultados positivos obtidos.

A partir de 1937, outros autores passam a se interessar pelas investigações sobre a hipotermia, mas nos anos posteriores ao de 1939, em um período histórico conturbado e sem laboratórios disponíveis, não puderam complementar os estudos⁽⁹⁾ que, na época, já constatavam que a hipotermia reduzia consideravelmente o metabolismo.

Essas pesquisas mostraram que tecidos conservados a temperaturas entre 0 a 4°C apresentavam decréscimo na taxa metabólica para 10%, e esse decréscimo no gasto do ATP ampliava o tempo de preservação^(43,44).

Nas décadas seguintes, os estudos se concentraram na preservação estática a frio ("cold storage"). Lapchinsky⁽⁴²⁾, em 1953, e Lillehei et al., em 1964, publicaram experimentos, relatando sucesso na preservação hipotérmica de membros e rins de cães, por 24 horas⁽⁴⁵⁾ e Belzer, no mesmo período, passou a estudar a preservação com a perfusão de uma solução de crioprecipitado de plasma⁽⁴⁶⁾.

A preservação a frio, entretanto, não se mostrou isenta de efeitos colaterais e observou-se que, à medida que se alongava o tempo de hipotermia, esses efeitos ficavam mais evidentes, suscitando a busca de soluções para contrapô-los.

Collins et al., em 1969, desenvolveram uma solução para uso em preservação renal hipotérmica, que continha, além de outras substâncias: elevado nível de potássio (para imitar a composição intracelular do rim); glicose; magnésio (Mg^{++}), para atuar como um estabilizador de membrana, e fosfato⁽⁴²⁾. Observou-se na ocasião que, com esses componentes, formava-se um inconveniente precipitado de fosfato de Mg^{++} , o que levou pesquisadores europeus a modificá-la, omitindo-se o Mg^{++} e utilizando-se o manitol em substituição à glicose. Essa solução, modificada, ficou conhecida como Euro-Collins⁽²³⁾.

No início dos anos 70, uma nova solução, denominada HTK (histidine-tryptophan-ketoglutarate), inicialmente indicada para cardioplegia em cirurgias do coração, elaborada por Bretschneider⁽⁴⁷⁾, passou a ser testada, também, na preservação do rim⁽⁴⁸⁾, do fígado⁽⁴⁹⁾, do pâncreas⁽⁵⁰⁾ e do intestino⁽⁵¹⁾.

Novos estudos sobre preservação e a descoberta de imunossupressores, nos anos 80, tornaram possível a realização de transplantes de fígado, pâncreas e intestino. Nessa época, Belzer et al. desenvolveram uma nova solução, na Universidade de Wisconsin (Solução de Belzer), indicada inicialmente para a preservação do fígado⁽⁴⁶⁾.

Da década de 90 até os dias atuais, várias soluções foram formuladas e vêm sendo avaliadas. Os estudos sobre preservação multiplicaram-se ainda mais, à medida em que ficou claro que, quanto mais graves as lesões de preservação, mais desfavoráveis são os resultados dos transplantes^(23,52).

De modo geral, as soluções são formuladas com o intuito de diminuir os efeitos lesivos da hipotermia e prover o órgão de substrato energético. Assim, as soluções contêm, por exemplo: impermeantes como histidine (soluções HTK e Celsior) e lactobionato (Celsior e Belzer), com o objetivo de reduzir o edema celular; tampões, como KH_2PO_4 , (Euro-Collins, e Belzer); e antioxidantes, como glutathione (Belzer, Celsior), que atuam eliminando os radicais livres de oxigênio⁽²³⁾. As principais diferenças entre as soluções estão na proporção das substâncias e na inclusão de um ou outro componente.

Especificamente em relação ao intestino delgado, há na literatura uma variedade de estudos clínicos e experimentais, comparando os efeitos protetores das diversas soluções de preservação^(2,30,38,41,53,54,55,56,57,58). Os resultados apresentados são díspares.

Leuvenink et al. compararam as soluções de Belzer e Celsior através de análises histológica e bioquímica, concluindo que a Celsior apresentou melhores resultados⁽⁵²⁾. Lai Wei et al., utilizando como parâmetros o MDA e grau de lesão da mucosa, compararam as soluções Polysol, Belzer, Celsior e HTK na preservação intestinal e concluíram que a solução Polysol foi superior à HTK e à Celsior, e estas duas, superiores à Belzer⁽³³⁾. DeRoover⁽⁵⁴⁾ et al. compararam as soluções Celsior e Belzer através da avaliação do grau de lesão da mucosa não observando diferença entre as duas. Baláz et al., comparando as soluções Custodiol e Belzer, também através de análise microscópica da mucosa, observaram melhores efeitos com a solução de Belzer⁽⁵³⁾.

Na realidade, não se conseguiu, ainda, desenvolver uma solução de preservação apropriada ou específica para a proteção intestinal. O intestino delgado, pelas suas peculiaridades, é órgão de difícil conservação e o tempo máximo de preservação, com os métodos atuais, segundo alguns autores, está em torno de 8 a 10 horas. Esse tempo é considerado baixo, quando comparado a órgãos como o rim, pâncreas, e fígado, sendo necessário buscar-se novas estratégias^(41,59).

Uma perspectiva surgiu quando alguns autores observaram através de estudos experimentais em cães que tecidos submetidos a ciclos curtos de isquemia e reperfusão, tornavam-se mais resistente à isquemia prolongada, inclusive com diminuição da área de necrose^(60,61). Esse fenômeno descrito inicialmente para o coração ficou conhecido como condicionamento isquêmico.

Posteriormente, observou-se que o PCI apresenta efeitos favoráveis e proteção a diferentes órgãos como pulmão⁽⁶²⁾, fígado,^(63,64) e inclusive ao intestino^(65,66,67,68) em situações decorrentes de I/R. Esses efeitos parecem ser mediados pela produção endógena de óxido nítrico (NO)^(69,70). Diversos autores têm mostrado que o fenômeno do PCI pode estar relacionado, também, à existência de alterações no metabolismo das

prostaglandinas e adenosina; a fatores de transcrição nuclear, como o NF- κ B; à alteração na produção de radicais livres de oxigênio (RLO); à síntese de enzimas antioxidantes; à expressão de moléculas de adesão intercelular (ICAM-1); e ao fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)^(71,72), dentre outros.

O PCI atua, principalmente, diminuindo a conversão do ATP em hipoxantina, decrescendo a capacidade de produção de RLO, além de estimular a produção de antioxidantes⁽⁷³⁾.

A maioria dos experimentos, que avaliou o PCI no intestino delgado, concluiu que a realização do procedimento resulta em efeitos benéficos^(67,74,75,76); porém, nem sempre os parâmetros analisados, como o grau de lesão intestinal, mostraram este efeito⁽⁷⁷⁾.

Na revisão da literatura realizada, constatou-se que os principais parâmetros utilizados nos experimentos, para avaliar as lesões de I/R e injúria isquêmica de preservação intestinal foram: bioquímicos, como a quantificação do LDH⁽⁷⁷⁾ e do ácido malondialdeído (MDA)⁽³⁰⁾, que avalia a lesão das membranas celulares pela lipoperoxidação por RLO; histológicos^(78,79,80), pela análise direta dos graus de lesão da mucosa; imunohistoquímicos, na avaliação da apoptose⁽⁷⁴⁾, na expressão dos antígenos de proliferação celular (Ki67, PCNA,^(76,81,82) e na avaliação da expressão das moléculas de adesão intercelular, ICAM-1⁽⁷⁸⁾, entre outros.

Os estudos sobre preservação de órgãos, inclusive os que se referem ao intestino delgado, mostram que este ainda é um campo aberto para investigação, instigante e desafiador. As principais estratégias disponíveis na atualidade são o uso da hipotermia em conjunto com as soluções de preservação, sendo o PCI um possível adjuvante.

Observou-se, concretamente, nos artigos revisados, que não há consenso na literatura sobre qual das soluções é a mais adequada para preservar o intestino e, nem tampouco há estudos experimentais que avaliem os efeitos do PCI em associação com as diferentes soluções de preservação. Atualmente, dentre as diversas soluções de preservação disponíveis, as soluções Celsior®, HTK (Custodiol®) e Belzer (Viaspam®), estão entre as mais utilizadas nos Centros Transplantadores do país.

Baseado na revisão realizada, julgou-se relevante avaliar se a associação do PCI com cada uma das soluções supracitadas apresentam efeito benéfico adicional.

Buscou-se contribuir, também, com a definição sobre qual das soluções de preservação apresenta, isoladamente, melhor desempenho na proteção do intestino delgado sob isquemia hipotérmica.

2. OBJETIVOS

a) Avaliar os efeitos do condicionamento isquêmico associado às soluções Celsior, Custodiol, Belzer e Ringer-Lactato na proteção do intestino delgado, durante a fase de preservação isquêmica hipotérmica;

b) Avaliar qual das soluções de preservação, isoladamente, tem mais eficácia na proteção do intestino delgado durante o período de preservação hipotérmica.

3. MÉTODOS

Esta pesquisa obteve aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM) com a Referência CEP nº. 1278/08 (pagina 86).

3.01 Delineamento experimental

Foram utilizados 56 ratos, 3 tipos de Soluções de Preservação e Solução de Ringer-Lactato. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 4 grupos de 14 animais cada, de acordo com o tipo de solução utilizada: no Grupo 1, utilizou-se a Solução de Ringer Lactato; no Grupo 2, Solução Celsior; no Grupo 3, Solução Custodiol e no Grupo 4, Solução de Belzer. Todos os grupos foram divididos em 2 subgrupos de 7 animais cada, para que fosse realizado condicionamento isquêmico (PCI) em metade dos animais de cada grupo (Figura 1). Em todos os animais realizou-se laparotomia e coleta de um segmento de intestino delgado (íleo) para preservação, por um período de 24 horas, na respectiva Solução de Preservação correspondente ao Grupo.

No decorrer do período de preservação foram coletadas amostras intestinais para análise e avaliação de qual das Soluções, em associação com o PCI, obtinha melhor desempenho na preservação intestinal. As variáveis estudadas foram: escore do grau de lesão da mucosa pelos critérios estabelecidos por *Park et al.* ⁽⁸³⁾; quantificação do MDA (ácido malondialdeído) tecidual intestinal, pelo teste do ácido tiobarbitúrico ⁽⁸⁴⁾ e índice de apoptose nas vilosidades intestinais.

3.02 Animais

Utilizou-se ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*), adultos, masculinos, com peso entre 250 e 300g (Tabela1), procedentes do Biotério Central da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Federal de Mato Grosso (FCM/UFMT). No período que precedeu o experimento, os animais foram confinados individualmente em gaiolas, alimentados com dieta própria para a espécie (Purina®) e acesso livre à água. A temperatura e os ciclos de claro e escuro no ambiente laboratorial foram controlados de modo que as condições permanecessem apropriadas para os animais participantes do experimento.

TABELA 1: Peso dos animais nos quatro grupos

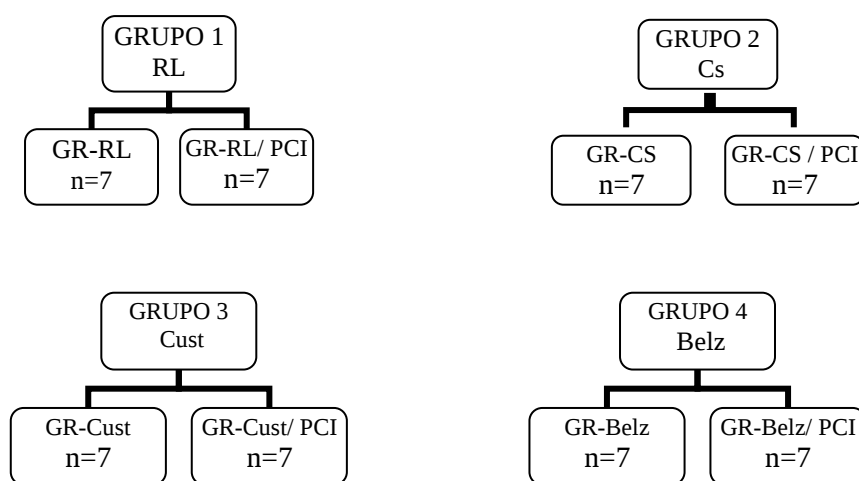
Grupo Animal	RL		CS		HTK		BELZER	
	Sem PCI	Com PCI	Sem PCI	Com PCI	Sem PCI	Com PCI	Sem PCI	Com PCI
1	279	285	278	267	268	298	272	265
2	268	260	270	273	274	278	269	290
3	270	254	269	261	296	260	259	277
4	255	269	296	260	275	280	272	285
5	265	279	259	276	291	290	270	274
6	285	260	285	280	255	268	263	264
7	300	266	292	285	280	292	291	267
MÉDIA	274,57	267,57	278,43	271,71	277,00	280,86	270,86	274,57
DP	14,7	11,0	13,3	9,48	13,8	13,60	10,12	10,11

ANOVA Sem PCI: RL vs CS vs CUS vs BELZ $p=0,723$
 Com PCI: RL vs CS vs CUS vs BELZ $p=0,185$

DP=Desvio padrão

3.03 Grupos

Após o período de 2 dias de adaptação ao laboratório, os animais foram distribuídos aleatoriamente nos 4 grupos, de acordo com o tipo de Solução de Preservação utilizada: no Grupo 1, denominado GR-RL, utilizou-se a Solução de Ringer Lactato®; no grupo 2, GR-Cs, Solução Celsior®; no Grupo 3, GR-Cust, Solução Custodiol®, também conhecida como solução de Histidina-Triptofano-Cetoglutarato (HTK); no Grupo 4, GR-Belz, Solução de Belzer, também denominada Solução Universidade Wisconsin. Todos os grupos foram divididos em 2 subgrupos de 7 animais; a única diferença entre eles foi a realização do condicionamento isquêmico intestinal nos animais dos subgrupos PCI (GR PCI).

Figura 1: Grupos

GR=grupo; RL=ringer lactato; PCI=precondicionamento isquêmico; Cs=Celsior; Cust=Custodiol ou Histidina-Triptofano-Cetoglutarato; Belz=Solução de Belzer (Universidade Wisconsin)

3.04 Soluções de Preservação

As formulações das principais soluções estão especificadas na tabela 2.

Observa-se que as diferenças nas composições bioquímicas e nutricionais estão na inclusão e nas proporções de uma ou outra substância. A Solução Celsior contém, por exemplo, glutathione e lactobionato, não contidas na Solução Custodiol, e esta, por sua vez, contém cetoglutarato e triptofano, não existentes na Solução Celsior.

A Solução de Belzer se diferencia das demais especialmente pela presença do HES, que lhe confere maior viscosidade.

TABELA 2: Componentes das Soluções de Preservação Belzer (UW), Custodiol (HTK) e Celsior (#)

SOLUÇÃO	Belzer	Custodiol	Celsior
Ano de introdução	1988	1975	1994
Origem	USA	Alemanha	França
Componentes			
Na ⁽⁺⁾ (mmol/L)	25-30	15	100
K ⁽⁺⁾ (mmol/L)	125-130	10	15
Mg ⁽⁺⁺⁾ (mmol/L)	5	13	4
Ca ⁽⁺⁺⁾ (mmol/L)	–	0,25	0,15
Manitol (g/L)	-	30	60
Lactobionato (mmol/L)	100	-	80
HES (g/L)	50	-	-
Rafinose (mmol/L)	30	-	-
Histidina (mmol/L)	-	180	30
H ₂ PO ₄ / HPO ₄ (mmol/L)	25	-	-
OH (mmol/L)	-	-	100
Glutaciona (mmol/L)	3	-	3
Alopurinol (mmol/L)	-	1	-
Adenosina (mmol/L)	5		-
Cetoglutarato (mmol/L)	-	1	-
Triptofano (mmol/L)	-	2	-
Ácido Glutâmico (mmol/L)	-	-	20
mOsm/L	320	310	320
pH	7,4	7,2	7,3
Viscosidade at 5 ⁰ C	5,7	1,8	1,3

adaptado de Xiao-Ning Feng, Xiao Xu and Shu-Sen Zheng -Current Status and Perspective of Liver Preservation Solutions - Hepatobiliary Pancreat Dis Int 2006; 5: 490-4

3.05 Procedimento anestésico

Os animais foram pesados em balança de precisão e, a seguir, anestesiados por via intramuscular com solução de cloridrato de quetamina

(90mg/Kg) e cloridrato de xilazina (20mg/Kg). A avaliação da eficácia da anestesia foi verificada pela ausência de reação do animal à preensão digital do coxim da pata traseira. As doses utilizadas foram suficientes para a realização de todos os procedimentos cirúrgicos, sem necessidade de doses extras. Antes de iniciar o procedimento cirúrgico propriamente dito, foram administradas aos animais 100 UI de heparina na veia dorsal da cauda.

3.06 Procedimento operatório

Após realização da anestesia, os animais foram posicionados em decúbito dorsal, com as patas dianteiras e traseiras fixadas em pranchas apropriadas para o procedimento. Realizou-se em seguida a depilação da parede abdominal anterior, a anti-sepsia da pele com PVPI e a delimitação do campo operatório pela colocação de campo fenestrado esterilizado.

O procedimento cirúrgico consistiu de laparotomia mediana, de 50 mm de extensão, iniciada no processo xifóide, em sentido crânio caudal, com diérese da pele, tecido celular subcutâneo, aponeurose muscular e peritônio (Figura 2). Após a abertura do peritônio, foi realizado o inventário da cavidade, exposição intestinal (Figura 3), abertura do retroperitônio, identificação, isolamento e reparo das artérias aorta e mesentérica superior (AMS), tendo como pontos de referência a coluna vertebral, a veia cava inferior, a raiz do mesentério e as artérias renais e a celíaca.



Figura 2: abertura da cavidade



Figura 3: exposição intestinal



Figura 4: isolamento de segmento ileal para preservação

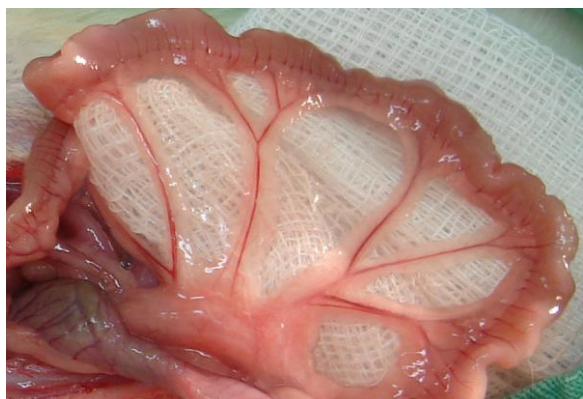
Nos animais dos subgrupos sem PCI, após a realização dos procedimentos cirúrgicos citados, e após vinte minutos de observação (figura 5), a aorta foi cateterizada imediatamente abaixo da AMS, sendo realizada, em seguida, a perfusão da respectiva Solução de Preservação correspondente ao grupo.

Nos animais dos subgrupos com PCI, após a realização dos procedimentos cirúrgicos iniciais relatados, foi realizado o PCI, que consistiu de oclusão da AMS, com pinça vascular tipo *bulldog*, durante dez minutos, provocando-se a isquemia intestinal (figura 6), sendo em seguida liberado o fluxo, pelo mesmo período, para reperfusão (figura 7). Ao se completar o período estabelecido para o PCI, a aorta foi cateterizada e procedeu-se à perfusão da respectiva Solução de Preservação correspondente ao grupo.

Imediatamente, ao se iniciar a infusão das Soluções de Preservação, se realizou toracotomia direita, dissecação e secção da veia cava inferior, em posição justa-diafragmática, para extravasamento e drenagem da solução infundida na arcada mesentérica. O clareamento do líquido extravasado indicava inequivocamente que o sistema vascular estava adequadamente limpo.

Figura 5: períodos observados durante os procedimentos

GRUPO SEM PCI: Procedimentos iniciais	Observação 20 minutos	INFUSÃO
GRUPO COM PCI: Procedimentos iniciais	PCI 20 minutos	INFUSÃO

**Figura 6:** Isquemia (PCI)**Figura 7:** Reperusão (PCI)

3.07 Infusão das Soluções de Preservação

O volume infundido em todos os animais foi de 40 ml, a uma velocidade de 120 ml/hora, de modo que demandava vinte minutos para infundir o montante proposto. Todas as soluções foram mantidas, previamente à infusão, à temperatura de 4 graus centígrados, em geladeira.

O total de volume a ser infundido foi estabelecido após verificação, em estudo-piloto, realizado no Laboratório de Microcirurgia da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia experimental da UNIFESP, que evidenciou ser este volume suficiente para clareamento do sistema vascular mesentérico. O cenário dos procedimentos cirúrgicos e da infusão das soluções, no laboratório de investigação da FCM/UFMT, é mostrado na Figura 8. O aspecto da alça após a perfusão da Solução é mostrada na Figura 9.



Figura 8: cenário de realização dos procedimentos: solução de preservação; bomba de infusão; animal de experimentação (Laboratório de Investigação da Faculdade de Medicina da UFMT)

3.08 Sacrifício

No momento em que se iniciava a infusão da Solução de Preservação, realizou-se a toracotomia direita, a secção da veia cava inferior e o sacrifício dos animais por exanguinação.

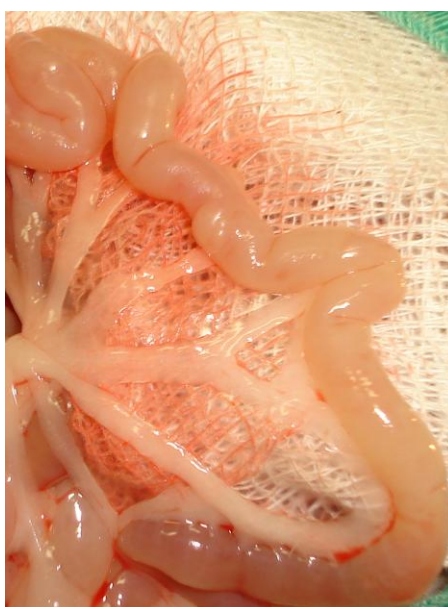


Figura 9: Alça intestinal após infusão da solução de preservação

3.09 Coleta do segmento intestinal para preservação

Ao se completar o período de infusão das soluções, coletou-se um segmento ileal de 20 cm, mensurados a partir de 2 cm da válvula íleo-cecal em sentido proximal. Desse segmento intestinal, 5 cm eram imediatamente separados para as análises laboratoriais, histológicas e imunohistoquímicas propostas para este experimento (amostra Zero hora). O restante, 15 cm, era colocado em um frasco contendo 50 ml da Solução de Preservação, referente ao grupo a que pertencia o animal. Este segmento ileal era preservado por um período de 24 horas à temperatura de 4^o C.

3.10 Coleta de amostras intestinais para estudo

Do segmento ileal, preservado sob hipotermia, eram coletadas amostras de 5 cm, ao se completarem os períodos de 12, 18 e 24 horas de preservação. Cada uma dessas amostras era destinada aos estudos morfológico, bioquímico (dosagem de MDA) e imunohistoquímico (índice de apoptose).

- Coleta de material para dosagem de MDA: As amostras coletadas para avaliação das lesões oxidativas das membranas celulares, nos períodos referidos, eram identificadas, envolvidas em papel alumínio e submersas em nitrogênio líquido para congelamento. Em um tempo máximo de 48 horas, após a coleta, o material era encaminhado ao Laboratório de Química da UFMT para dosagem do MDA.

- Coleta de amostras intestinais para avaliação morfológica: As amostras de 1 cm, coletadas para avaliação do grau de lesão da mucosa, eram colocadas em frascos identificados, contendo formol, tamponado a 10%, e enviadas para o Laboratório de Patologia do HUJM/UFMT, para preparo em blocos de parafina e lâminas, coradas pela hematoxilina–eosina (HE).

- Coleta de amostras intestinais para avaliação do índice de Apoptose: A coleta das amostras para avaliação do grau de apoptose da mucosa intestinal foi realizada da mesma forma relatada para avaliação morfológica.

Os blocos de parafina, preparados para esta avaliação, foram enviados ao Laboratório de Patologia da UNIFESP, para o preparo das lâminas e mensuração dos índices de apoptose.

3.11 Preparo das amostras e dosagem do MDA

A dosagem do MDA foi realizada pelo teste do ácido tiobarbitúrico (TBARS)⁽⁸⁴⁾. Este teste baseia-se na reação do MDA com o referido ácido, em pH baixo e temperatura elevada, formando o complexo MDA-TBA, de cor e absorbância característica. Este tipo de dosagem pode ser realizado no soro, no plasma, nos líquidos e demais tecidos orgânicos. Cada molécula de MDA reage com 2 moléculas do ácido tiobarbitúrico, gerando uma coloração que pode ser detectada em espectrofotômetro. Foram utilizadas 2 amostras do Grupo Controle para o ajuste da técnica, objetivando a determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em tecidos, e os resultados obtidos nessa etapa de calibração não foram incluídos nesse estudo.

Os tecidos, ainda congelados, foram separados em alíquotas de 50 mg, macerados sob banho de gelo e suspensos em 1 ml de solução salina. Foram retirados 100 µl da amostra, adicionados a 100 µl da Solução SDS (sulfato de sódio) e a 2,5 ml de tampão reagente TBA (ácido acético, ácido tiobarbitúrico e hidróxido de sódio). Os tubos foram cobertos e incubados a 95°C durante 60 minutos. Após o período de incubação os tubos foram resfriados e centrifugados, durante 15 minutos, a 3000 rpm. O sobrenadante foi removido, disposto em cubetas e analisado em um espectrofotômetro com comprimento de onda de 532 nm.

3.12 Preparo das amostras para estudo morfológico

Após um período máximo de 48 horas de fixação em formaldeído, as amostras intestinais foram submetidas a trocas sucessivas com álcool a 70^o GL, progressivamente até 100^oGL, e a 3 imersões em parafina. As primeiras, por 2 horas e a terceira, por 30 minutos em vácuo. Após a inclusão em parafina os fragmentos foram submetidos a cortes de 4µm de espessura, em micrótomo rotativo, anexados em lâminas e corado pela H.E. As análises

dos graus de lesão foram realizadas em microscópio óptico, por um patologista que desconhecia os dados do projeto.

O grau de lesão da mucosa foi classificado de acordo com os critérios propostos por Park et al⁽⁸³⁾, que se compõem de oito graduações (figura 11), desde mucosa normal, grau zero; pequena fenda no topo das vilosidades, grau 1, até lesões mais profundas com infarto transmural e necrose da camada muscular própria, grau 8.

Tabela 3: Escore de lesão na mucosa intestinal de acordo com proposição de Park et al.

Grau 0	Mucosa normal
Grau 1	Espaço sub-epitelial na porção superior da vilosidade e congestão papilar.
Grau 2	Aumento do espaço sub-epitelial com elevação moderada da camada epitelial.
Grau 3	Grande elevação epitelial com espaços nas laterais das vilosidades.
Grau 4	Vilosidades desnudas com exposição da lâmina própria, capilares dilatados, aumento da celularidade na lâmina própria.
Grau 5	Perda das vilosidades.
Grau 6	Comprometimento as criptas.
Grau 7	Necrose de toda a mucosa intestinal.
Grau 8	Infarto transmural com necrose da camada muscular própria.

3.13 Preparo das amostras para estudo imunohistoquímico

Para reação imunohistoquímica, foi utilizado o método da estreptavidina-biotina. Os anticorpos primários utilizados foram: anticorpo monoclonal anti-smac/diablo (1067) (CALBIOCHEM), na diluição 1:400; anticorpo primário AIF (H-300): sc-5586 (SANTA CRUZ), na diluição 1:1000; anticorpo primário citocromo c (C-20): sc-8385 (SANTA CRUZ), na diluição 1:500; anticorpo policlonal anti-caspase-3-clivada (Ap1027) (CALBIOCHEN), na diluição 1:1000. O sistema de amplificação utilizado foi o KIT LSAB+System, HRP (DAKO, CA- USA).

Foram realizados cortes histológicos de 4 micrômetros de espessura, anexados em lâminas tratadas com 3-aminopropiltietoxisilano

(Sigma,Co-USA-A3648) e deixados em estufa a 60° por 12h; A desparafinização das lâminas foi realizada com um banho de xilol por 30 minutos em temperatura ambiente; a hidratação, realizada com 3 banhos de etanol em concentrações decrescentes (banhos de etanol a 95% ,80% e 70%, sequencialmente) e lavagem em água corrente. A recuperação antigênica foi feita com o uso de microondas, em tampão citrato, pH 6.0, em potência alta por 20 minutos, deixando-se esfriar em temperatura ambiente por, também, 20 minutos, seguida de lavagem em água corrente. O bloqueio da peroxidase endógena ocorreu pela aplicação de água oxigenada a 3%, por 4 vezes, 5 minutos cada, lavando-se, em seguida, em água corrente e tampão PBS, pH 7,4 com BSA.

A incubação com o anticorpo primário (diluído em título preestabelecido) em solução de BSA 1% diluída em PBS foi feita em câmara úmida a 4°, por 18 h., seguida de lavagem em tampão PBS, por 2 vezes. Já a incubação com o anticorpo secundário biotinilado (Kit Advance - DAKO, Denmark) foi feita em câmara úmida em temperatura ambiente por 30 minutos, acrescida de lavagem em tampão PBS, pH 7.4, por 2 vezes. Por sua vez, a incubação com o complexo streptavidina-biotina peroxidase (Kit Advance – DAKO, Denmark) foi realizada em câmara úmida, em temperatura ambiente por 30 minutos, seguida de lavagem em tampão PBS, pH 7.4, por 2 vezes. Para revelação, foi utilizado o substrato cromogênico (3,3 diaminobenzedine – DAB - Sigma Chemical Co-USA), por 5 minutos a 37°C, além de lavagem, até a retirada de todo o excesso com água destilada.

A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Harris por 1 minuto, tendo sido retirado o excesso de hematoxilina com água destilada. Para montagem, as lâminas foram desidratadas com 3 banhos de etanol em concentrações crescentes de 2 minutos cada: um banho em etanol a 70%; o segundo, a 80%, e, finalmente, o terceiro em etanol a 95%. A diafanização foi realizada em 3 banhos de xilol de 2 minutos cada. As lâminas foram montadas em resina Entellan (SIGMA) e lamínula.

O índice de expressão das moléculas de caspase foi calculado pela contagem de 1.000 células em cada lâmina. Foi considerado como padrão de positividade o aparecimento de coloração marrom-acastanhada na região da matriz citoplasmática. O índice de apoptose foi computado em percentual.

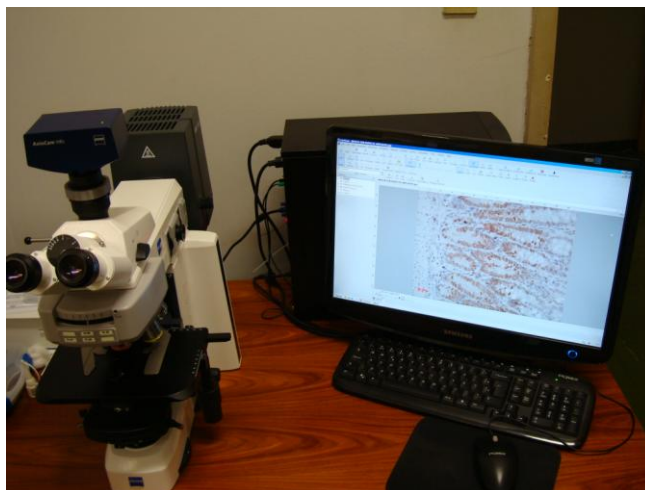


Figura 10: Sistema informatizado para quantificação de células apoptóticas

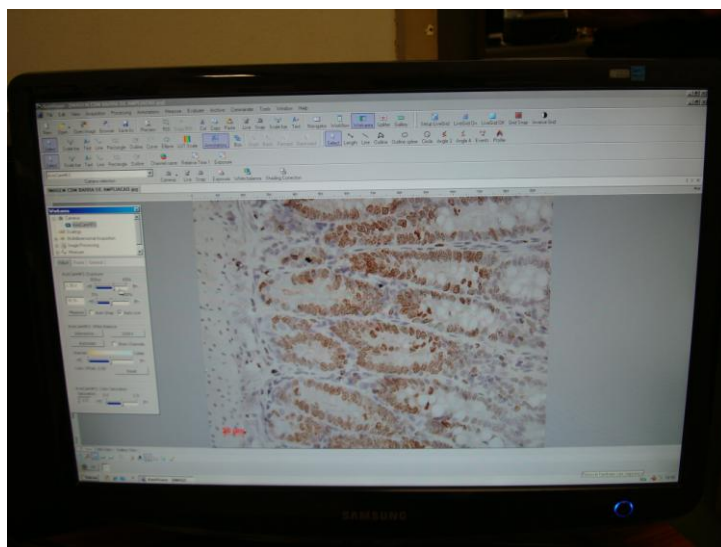


Figura 11: Sistema informatizado para quantificação celular por imunohistoquímica (imagem em maior detalhe)

3.14 Análise estatística

As variáveis analisadas foram: bioquímica (MDA), histológica (grau de lesão da mucosa) e imunohistoquímica (apoptose nas vilosidades intestinais).

Foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov, para verificar se as variáveis quantitativas contínuas apresentavam distribuição normal, e o teste de Levene, para verificar a homoscedacidade das variâncias. Para as variáveis,

com distribuição normal, foram utilizados testes paramétricos, análise de variância (ANOVA) e de Tukey, quando se detectava diferença estatística. Para os dados ordinais, referente ao grau de lesão da mucosa, foram utilizados testes não-paramétricos de Kruskal-Wallis e Mann-Whitney, quando se detectava diferença estatística. .

Fixou-se em 0,05 ou 5% o nível de rejeição da hipótese de nulidade. Foram considerados estatisticamente significantes os valores de $p < 0,05$.

Foram realizadas comparações entre os subgrupos sem PCI, para averiguar qual das Soluções de Preservação proporcionou melhor proteção à mucosa intestinal, e, entre os subgrupos com PCI, para averiguar se o PCI em associação com as soluções de preservação apresentava resultados diferentes.

Todos os cálculos estatísticos foram realizados, utilizando-se o Programa SPSS (*Statistical Package for the Social Science*) for Windows, versão 15.0

4. RESULTADOS

A apresentação dos resultados dos parâmetros estudados, MDA e Apoptose, foi feita com a seguinte ordenação, em cada um deles: tabela com as médias e desvio-padrão dos Grupos sem PCI, com os respectivos cálculos estatísticos, comparando as Soluções (isoladamente); tabela com a média e o desvio-padrão dos Grupos com PCI, com os cálculos, comparando os efeitos das Soluções em associação com o PCI. Em seguida, as médias sem e com PCI estão apresentadas, também, separadamente, em forma de gráfico.

Os resultados do grau de lesão da mucosa são apresentados em tabela, com as médias, desvio-padrão e medianas de cada grupo, com os cálculos estatísticos, não paramétricos, pertinentes. Estes resultados estão representados, também, em 2 gráficos, com os Grupos sem e com PCI.

Os resultados gerais detalhados, com todos os valores referentes a cada um dos 7 animais de cada grupo, sem e com PCI, nos Grupos Ringer, Celsior, Custodiol e Belzer, estão apresentados nos anexos da tese.

4.01 MDA

Na avaliação do MDA observou-se que os grupos sem PCI e preservados com Ringer-Lactato apresentaram os piores resultados, com valores mais elevados de MDA. Os demais grupos apresentaram resultados semelhantes (**Tabela 4 e Gráfico1**).

Com a realização do PCI, no período de 12 horas de preservação, os segmentos intestinais preservados com Custodiol apresentaram significativamente maiores valores de MDA; portanto, mais lesão da membrana celular por lipoperoxidação do que os preservados com a Solução de Belzer (**Tabela 5 e Gráfico 2**). Após 18 horas de preservação, observa-se queda progressiva do MDA em todos os Grupos.

TABELA 4: Média e desvio-padrão dos valores do MDA em nmol/mg de tecido nos Grupos Ringer, Celsior, Custodiol e Belzer, sem condicionamento isquêmico, com Zero, 12,18 e 24 horas de preservação

	Ringer	Celsior	Custodiol	Belzer	<i>p</i>
Zero	2,40±0,5	1,52±0,9	2,30±0,4	1,57±0,8	0,104
12	3,56±1,1	2,33±1,6	2,90±1,1	1,70±0,7	0,053
18	4,40±1,6	3,50±1,4	2,37±0,6	2,70±0,9	0,030
24	4,21±1,0	3,26±1,4	2,00±1,0	2,52±0,6	0,005

Cálculo estatístico comparando os quatro grupos sem PCI: ANOVA / TUKEY

zero p=0,104 / RL=Celsior (p=0,206) RL=Custodiol (p=0,993); RL=Belzer (p=0,246); Custodiol=Celsior (p=0,316); Celsior=Belzer (p=0,100); Custodiol=Belzer (p=0,368)

12h p=0,053 / RL=Celsior (p=0,241); RL=Custodiol (p=0,792); RL>Belzer (p=0,046); Celsior=Custodiol (p=0,745); Celsior=Belzer (p=0,825); Custodiol=Belzer (p=0,267)

18h p=0,030 / RL=Celsior (p=0,542); RL>Custodiol (p=0,028); RL=Belzer (p=0,102); Celsior=Custodiol (p=0,358); Celsior=Belzer (p=0,715); Custodiol=Belzer (p=0,927)

24h p=0,005 / RL=Celsior (p=0,376); RL>Custodiol (p=0,005); RL>Belzer (p=0,035); Celsior=Custodiol (p=0,168); Celsior=Belzer (p=0,582); Custodiol=Belzer (p=0,825)

Teste de Kolmogorov-Smirnov

Zeroh p=0,447965 12h p=0,924772 18h p=0,680799 24h p=0,934127

Teste de Levene

Zeroh p=0,792 12h p= 0,508 18h p= 0,163 24h p=0,252

TABELA 5: Média e desvio-padrão dos valores do MDA em nmol/mg de tecido nos Grupos Ringer, Celsior, Custodiol e Belzer, com condicionamento isquêmico, com Zero, 12, 18 e 24 horas de preservação

	Ringer	Celsior	Custodiol	Belzer	<i>p</i>
Zero	2,87±1,0	1,50±0,8	2,80±1,2	1,50±0,6	0,015
12	3,10±0,8	1,92±0,8	2,80±0,6	1,60±0,5	0,002
18	4,30±1,4	3,10±0,8	3,03±0,5	2,30±0,7	0,007
24	3,90±1,5	2,20±0,7	2,00±0,7	1,47±0,8	0,001

Calculo estatístico comparando os quatro grupos com PCI: ANOVA / Tukey

zero p=0,015 / RL=Celsior (p=0,087) RL=Custodiol (p=0,100); RL=Belzer (p=0,070); Celsior= Custodiol (p=0,091); Celsior=Belzer (p=0,100); Custodiol=Belzer (p=0,074)

12h p=0,002 / RL>Celsior (p=0,016); RL= Custodiol (p=0,784); RL>Belzer (p=0,003); Celsior=Custodiol (p=0,121); Celsior=Belzer (p=0,904); Custodiol >Belz (p=0,029)

18h p=0,007 / RL=Celsior (p=0,129); RL=Custodiol (p=0,086); RL>Belzer(p=0,004); Celsior= Custodiol (p=0,997); Celsior =Belzer (p=0,407); Custodiol=Belzer (p=0,529)

24h p=0,001 / RL>Celsior (p=0,020); RL>Custodiol (p=0,012); RL>Belzer (p=0,001) Celsior=Custodiol (p=0,996); Celsior=Belzer (p=0,524); Custodiol=Belzer(p=0,658)

Teste de Kolmogorov-Smirnov

Zero h p =0,742769 12h p=0,70366 18h p=0,753419 24 h p=0,759838

Teste de Levene

Zero h p=0,170 12h p=0,312 18h p= 0,0170 24h p=0,0270

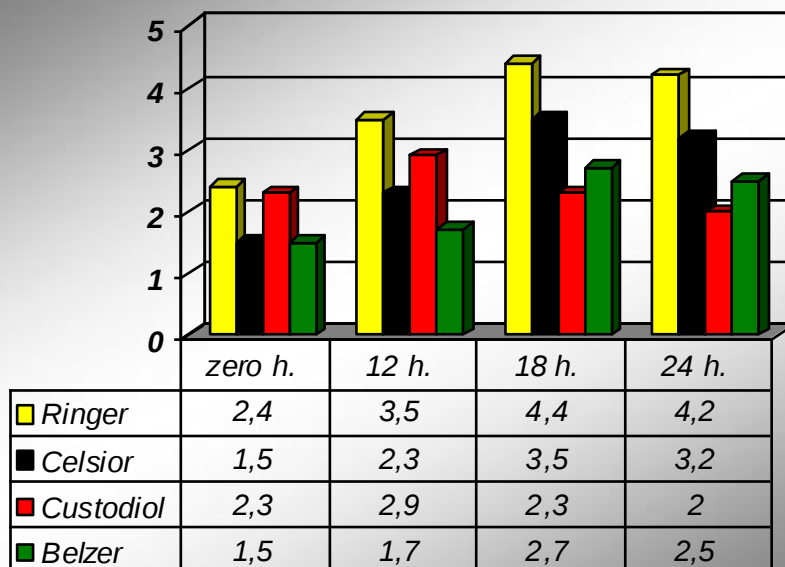


Gráfico 01

Valores do MDA em nmol/mg de tecido nos grupos Ringer-Lactato, Celsior, Custodiol e Belzer, sem condicionamento isquêmico, com Zero, 12, 18 e 24 horas de preservação

Considerando os cálculos estatísticos (ANOVA / TUKEY):

Zero RL=Custodiol=Celsior=Belzer

12h RL>Belzer =Custodiol=Celsior

18h RL>Custodiol=Celsior=Belzer

24h RL>Custodiol=Celsior=Belzer

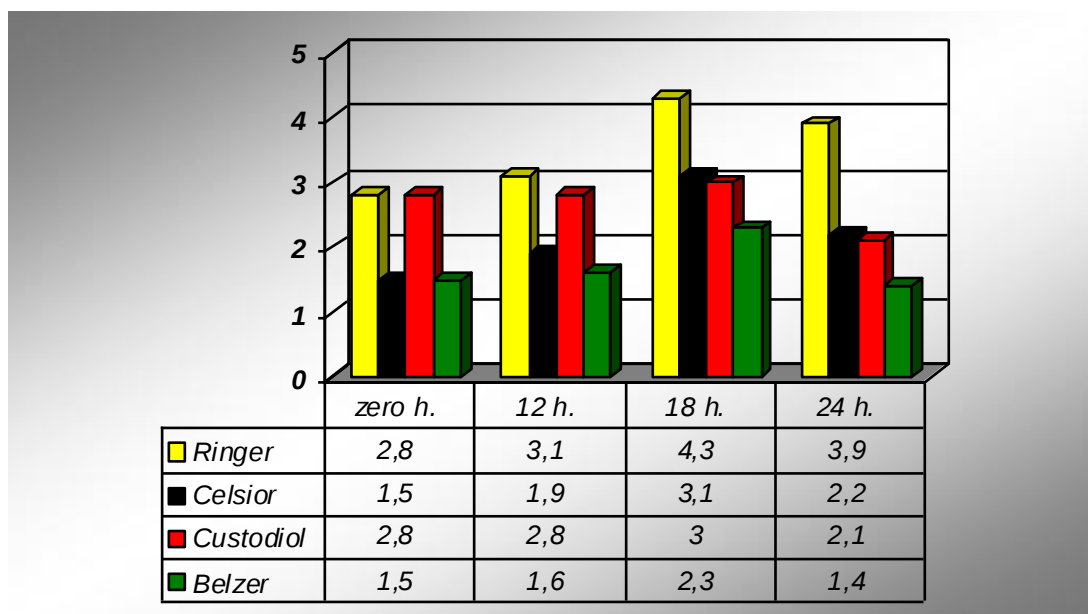


Gráfico 02

Valores do MDA em nmol/mg de tecido nos grupos Ringer-Lactato, Celsior, Custodiol e Belzer, com condicionamento isquêmico, com Zero, 12, 18 e 24 horas de preservação

Considerando os cálculos estatísticos (ANOVA / TUKEY):

zero RL=Custodiol=Celsior=Belzer

12h RL=Custodiol>Belzer=Celsior

18h RL>Belzer=Custodiol=Celsior

24h RL>Custodiol=Celsior=Belzer

4.02 Grau de lesão da mucosa

Nos resultados referentes aos graus de lesão da mucosa observa-se progressão das lesões com o decorrer do tempo de preservação e diminuição no grau das mesmas com a realização do PCI (**Tabela 6, Gráfico 3 e 4**).

O Grupo Ringer Lactato, em todos os momentos, apresenta maiores graus de lesão. Com 12, 18 e 24 horas de preservação, o Grupo Custodiol apresentou maiores graus de lesão do que o Celsior e o Belzer, sendo que esses resultados se tornaram ainda mais evidentes e mais expressivos com a realização do PCI (**Gráfico 4**).

TABELA 6: Média, desvio-padrão e mediana dos graus de lesão da mucosa com Zero, 12,18 e 24 horas de preservação nos Grupos Ringer, Celsior, Custodiol e Belzer, sem e com condicionamento isquêmico

	RINGER		CELSIOR		CUSTODIOL		BELZER	
	sem pci	com pci	sem pci	com pci	sem pci	com pci	sem pci	com pci
0h.	1,1±0,6	1,0±0,8	0,5±0,5	0,1±0,3	0,8±0,3	0,6±0,5	0,4±0,5	0,1±0,3
Med	1	1	1	0	1	1	0	0
12h	4,0±0,5	3,4±0,5	2,0±0,7	1,4±0,5	3,0±0,8	2,4±0,5	2,1±0,7	1,5±0,5
Med	4	3	2	1	3	2	2	2
18h	5,4±0,5	4,4±0,5	3,2±0,4	2,5±1,1	4,4±0,7	3,7±0,7	3,4±0,7	2,2±0,4
Med	5	4	3	2	5	3	3	2
24h	6,5±0,5	6,4±0,5	4,0±0,8	3,5±0,7	5,5±1,1	5,0±0,5	3,8±0,6	3,7±0,7
Med	7	6	4	3	5	5	4	4

Med=mediana; sem pci=sem condicionamento; com pci=com condicionamento
Cálculo estatístico: KRUSKAL-WALLIS / MANN-WHITNEY

SEM PCI

zero p=0,124 / RL=Custodiol (p=0,33); RL=Celsior (p=0,11); RL=Belzer (p=0,58); Celsior=Custodiol(p=0,25); Celsior=Belzer(p=0,60); Custodiol=Belzer (p=0,107)

12h p=0,002 / RL>Celsior (p=0,002); RL>Custodiol (p=0,027); RL>Belzer (p=0,002); Celsior=Custodiol (p=0,133); Celsior=Belzer (p=0,674); Custodiol=Belzer (p=0,065)

18h p=0,001 / RL>Celsior (p=0,001); RL>Custodiol (p=0,019); RL>Belzer(p=0,002); Custodiol>Celsior (p=0,014); Celsior=Belzer (p=0,087); Custodiol>Belzer (p=0,040)

24h p=0,0001 / RL>Celsior (p=0,001); RL=Custodiol (p=0,079);RL>Belzer (p=0,001); Custodiol>Celsior (p=0,017); Celsior=Belzer (p=0,728); Custodiol>Belzer(p=0,008)

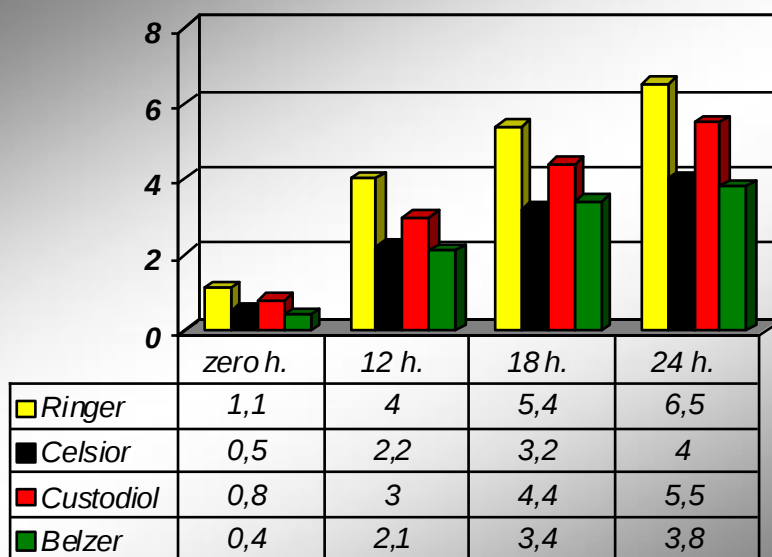
COM PCI

zero p=0,042 / RL>Celsior(p=0,031); RL=Custodiol(p=0,293); RL>Belzer (p=0,031); Celsior=Custodiol (p=0,107); Celsior=Belzer (p=1,000); Custodiol=Belzer (p=0,107)

12h p=0,0001 / RL>Celsior(p=0,001); RL>Custodiol(p=0,010); RL>Belzer (p=0,001);Custodiol>Cs (p=0,010); Celsior=Belzer (p=0,606); Custodiol>Belzer (p=0,018)

18h p=0,001 / RL>Celsior (p=0,011); RL=Custodiol (p=0,071); RL>Belzer (p=0,001);Custodiol>Celsior(p=0,028);Celsior=Belzer(p=0,872); Custodiol>Belzer (p=0,0040)

24h p=0,0001 / RL>Celsior (p=0,001); RL=Custodiol (p=0,002); RL>Belzer (p=0,001); Custodiol>Celsior (p=0,007); Celsior=Belzer (p=0,674); Custodiol>Belzer(p=0,008)



Cálculo estatístico: KRUSKAL-WALLIS / MANN-WHITNEY

Gráfico 03

Grau de lesão da mucosa nos grupos Ringer Lactato, Celsior, Custodiol e Belzer, sem condicionamento isquêmico, com Zero, 12, 18 e 24 horas de preservação

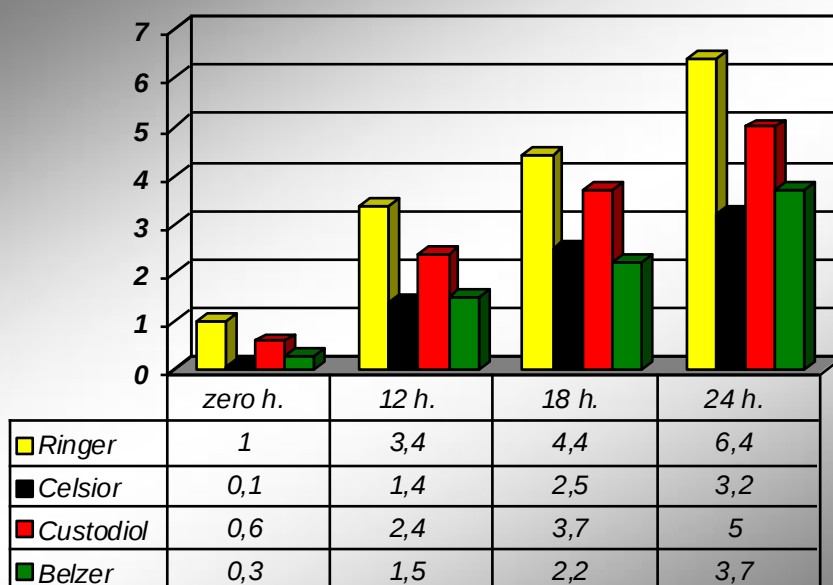
Considerando os cálculos estatísticos (MANN-WHITNEY):

0h:RL=Celsior=Custodiol=Belzer

12h:RL>Belzer*=Celsior*=Custodiol

18h:RL>Custodiol>Celsior=Belzer

24h:RL=Custodiol>Belzer=Celsior



Cálculo estatístico: KRUSKAL-WALLIS // MANN-WHITNEY

Gráfico 04

Grau de lesão da mucosa nos grupos Ringer Lactato, Celsior, Custodiol e Belzer, com preconditionamento isquêmico, com Zero, 12, 18 e 24 horas de preservação

Considerando os cálculos estatísticos

0h: RL > Celsior* = Custodiol = Belzer*

12h: RL > Custodiol > Celsior = Belzer

18h: RL = Custodiol > Celsior = Belzer

24h: RL > Custodiol > Celsior = Belzer

4.03 Apoptose

Com exceção das amostras zero hora, em todos os outros momentos o percentual de células apoptóticas nas vilosidades intestinais foi maior nos grupos Ringer-Lactato e Custodiol e, portanto, menor nos Grupos Belzer e Celsior, tanto nos grupos sem PCI quanto nos com PCI (**Tabelas 7 e 8**). Sem PCI, nos períodos com 12 e 18 horas de preservação, os Grupos Belzer e Celsior apresentaram os menores valores de apoptose, e com a realização do PCI, além dos períodos citados, os resultados se tornaram favoráveis a estes Grupos, também com 24 h de preservação (**Gráfico 5 e 6**).

Os resultados gerais dos valores da apoptose, em todos os animais, estão apresentados nos anexos (**Tabelas 14 a 17**).

TABELA 7: Média e desvio padrão do percentual de células em apoptose nos Grupos Ringer, Celsior, Custodiol e Belzer, sem condicionamento isquêmico, com Zero, 12, 18 e 24 horas de preservação

	Ringer	Celsior	Custodiol	Belzer	<i>p</i>
Zero	2,20±0,4	2,0±0,8	2,4±0,9	1,7±0,9	0,40
12	5,10±1,3	3,1±1,0	4,5±1,8	2,1±0,9	0,01
18	13,1±2,4	7,4±1,9	11,7±2,2	7,2±1,9	0,001
24	35,2±6,9	18,1±5,6	24,5±3,1	16,8±3,9	0,001

Calculo estatístico comparando os quatro grupos sem PCI: ANOVA /Tukey

Zero p=0,400 / RL=Celsior (p=0,917); RL=Custodiol (p=0,988); RL=Belzer (p=0,580); Celsior=Custodiol(p=0,770); Celsior=Belzer(p=0,917); Custodiol=Belzer (p=0,393)

12h p=0,01 / RL>Celsior (p=0,043); RL=Custodiol (p=0,817); RL>Belzer (p=0,002); Celsior=Custodiol(p=0,278); Celsior=Belzer(p=0,502); Custodiol>Belzer (p=0,019)

18h p=0,001 / RL>Celsior (p=0,00); RL=Custodiol (p=0,615); RL>Belzer (p=0,00); Custodiol>Celsior (p=0,006); Celsior=Belzer (p=0,999); Custodiol>Belzer (p=0,004)

24h p=0,001 / RL> Celsior (p=0,00); RL>Custodiol (p=0,004); RL>Belzer (p=0,00); Celsior=Custodiol (p=0,124); Celsior=Belzer (p=0,968); Custodiol=Belzer(p=0,060)

Teste de Kolmogorov-Smirnov

Zero h p=0,103855 12h p=0,368792 18h p=0,730839 24 h p=0,84088

Teste de Levene

Zero h p=0,261 12h p=0,195 18h p= 0,796 24h p=0,293

TABELA 8: Média e desvio padrão do percentual de células em apoptose nos Grupos Ringer, Celsior, Custodiol e Belzer, com condicionamento isquêmico, com Zero, 12, 18 e 24 horas de preservação

	Ringer	Celsior	Custodiol	Belzer	<i>p</i>
Zero	1,5±0,5	1,0±0,5	1,2±0,7	1,0±1,1	0,62
12	3,4±1,9	1,5±0,7	3,2±1,1	1,2±0,4	0,03
18	8,9±1,7	3,0±1,1	5,4±1,7	3,0±1,1	0,001
24	24,2±3,5	12,1±3,2	18,2±2,1	12,5±3,7	0,001

Calculo estatístico comparando os quatro grupos com PCI: ANOVA / Tukey

Zero $p=0,62$ / RL=Celsior ($p=0,684$); RL=Custodiol ($p=0,963$); RL=Belzer ($p=0,684$); Celsior=Custodiol ($p=0,910$); Celsior=Belzer ($p=0,100$); Custodiol=Belzer ($p=0,910$)

12h $p=0,030$ / RL>Celsior ($p=0,036$); RL=Custodiol ($p=0,996$); RL>Belzer ($p=0,013$); Custodiol >Celsior ($p=0,059$); Celsior=Belzer ($p=0,970$); Custodiol>Belzer ($p=0,022$)

18h $p=0,001$ / RL>Celsior ($p=0,0001$); RL>Custodiol ($p=0,007$); RL>Belzer ($p=0,00$); Custodiol>Celsior ($p=0,026$); Celsior=Belzer ($p=0,10$); Custodiol>Belzer ($p=0,026$)

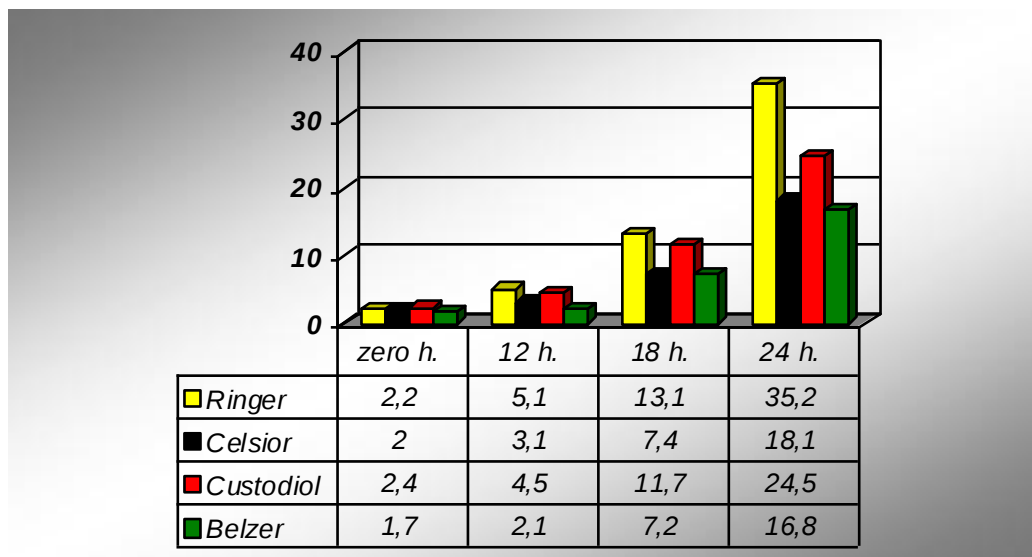
24h $p=0,001$ / RL>Celsior ($p=0,0001$); RL>Custodiol ($p=0,009$); RL>Belzer ($p=0,00$); Custodiol>Celsior ($p=0,008$); Celsior=Belzer ($p=0,997$); Custodiol>Belzer($p=0,017$)

Teste de Kolmogorov-Smirnov

Zero h $p=0,052305$ 12h $p=0,067083$ 18h $p=0,456731$ 24 h $p=0,663218$

Teste de Levene

Zero h $p=0,178$ 12h $p=0,195$ 18h $p=0,346$ 24h $p=0,334$



Cálculo estatístico: ANOVA / TUKEY

Gráfico 05

Valores percentuais do índice de apoptose nas vilosidades intestinais nos grupos Ringer-Lactato, Celsior, Custodiol e Belzer, sem condicionamento isquêmico, com Zero, 12, 18 e 24 horas de preservação

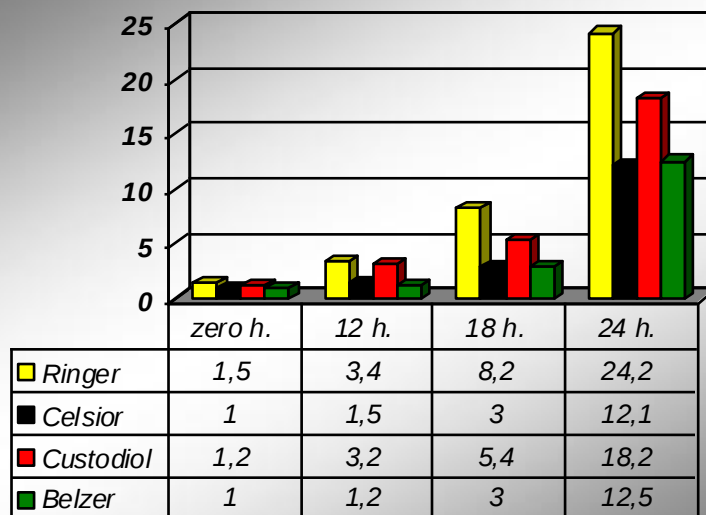
Considerando os cálculos estatísticos
(ANOVA / TUKEY):

0h: RL=Celsior=Custodiol=Belzer

12h: RL=Custodiol > Belzer=Celsior

18h; RL=Custodiol>Celsior=Belzer

24h: RL>Custodiol=Belzer=Celsior



Calculo estatístico: ANOVA / Tukey

Gráfico 06

Valores percentuais do índice de apoptose nas vilosidades intestinais nos grupos Ringer-Lactato, Celsior, Custodiol e Belzer, com condicionamento isquêmico, com Zero, 12, 18 e 24 horas de preservação

Considerando os cálculos estatísticos (ANOVA / Tukey):

Zero: RL=Celsior=Belzer=Custodiol

12h: RL=Custodiol>Celsior =Belzer

18h: RL>Custodiol>Celsior=Belzer

24h: RL>Custodiol > Celsior=Belzer

A seguir serão apresentadas as fotos representativas dos graus de lesão da mucosa, apoptose e células marcadas com o anti-caspase 3, observados no experimento (**figuras 12 a 22**).

- Graus de lesão da mucosa:

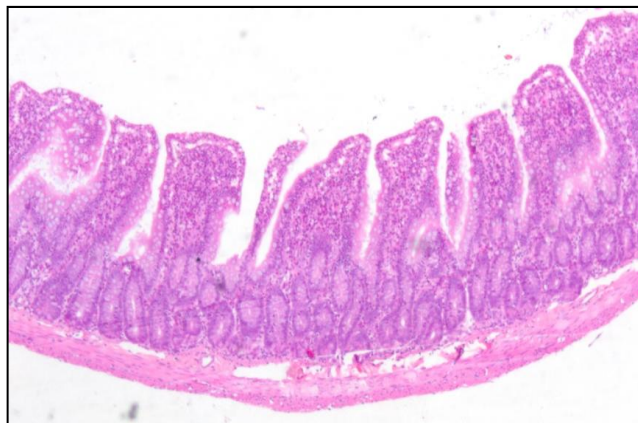


Figura 12: lesão grau

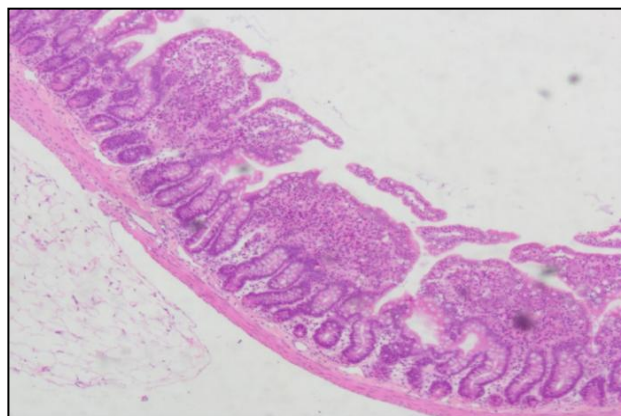


Figura 13: lesão grau 2

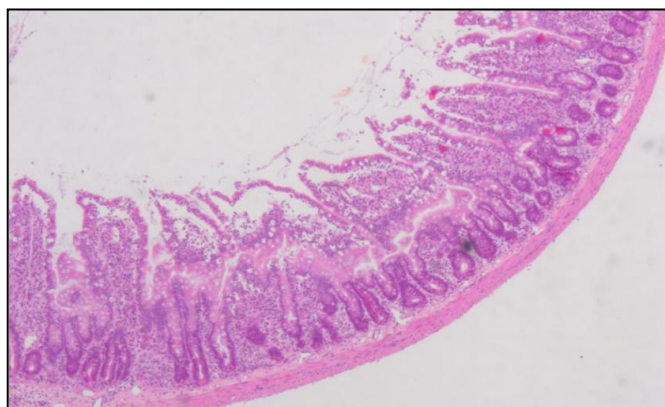


Figura 14: lesão grau 3

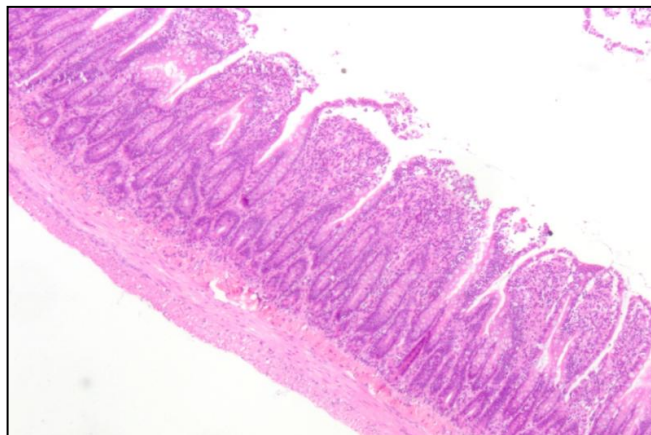


Figura 15: lesão grau 4

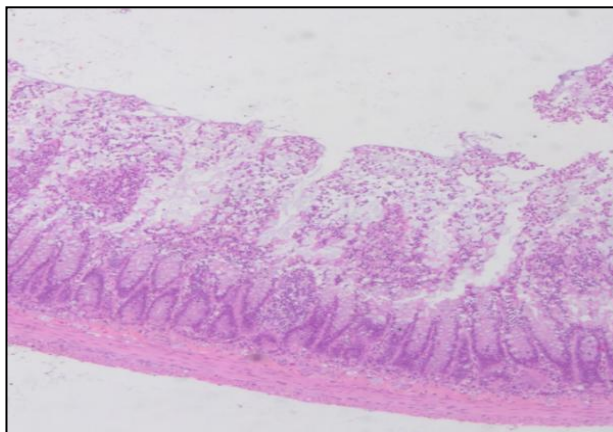


Figura 16: lesão grau 5

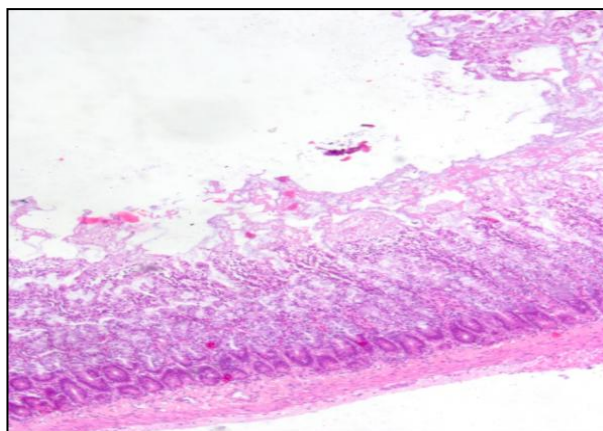


Figura 17: lesão grau 6

- Apoptose nas vilosidades intestinais

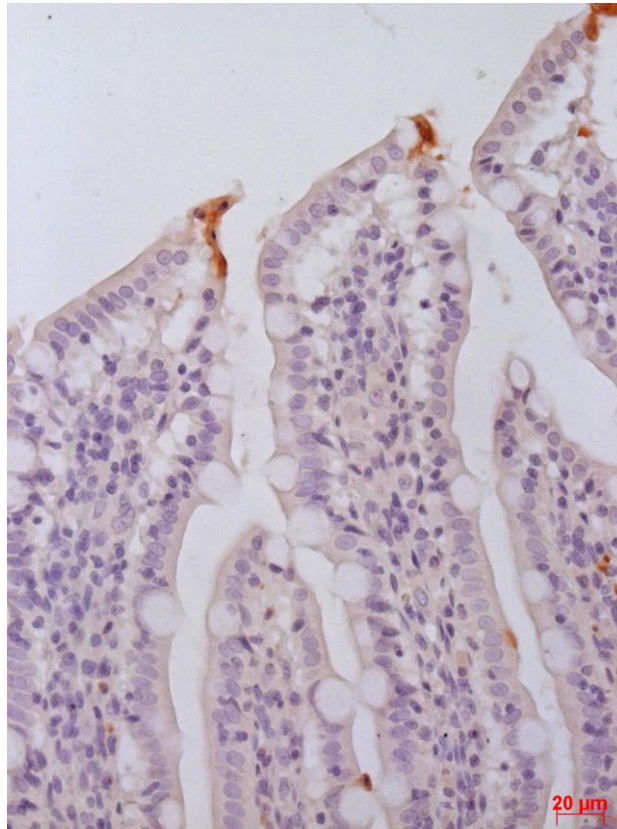


Figura 18: Apoptose nos vilos intestinais, Grupo RL, Zero hora de preservação

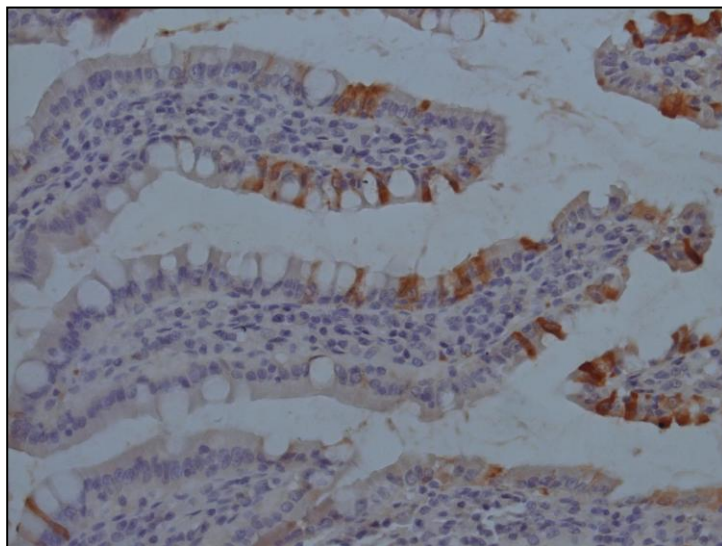


Figura 19: Apoptose nos vilos intestinais, Grupo Celsior, 12 horas de preservação com PCI

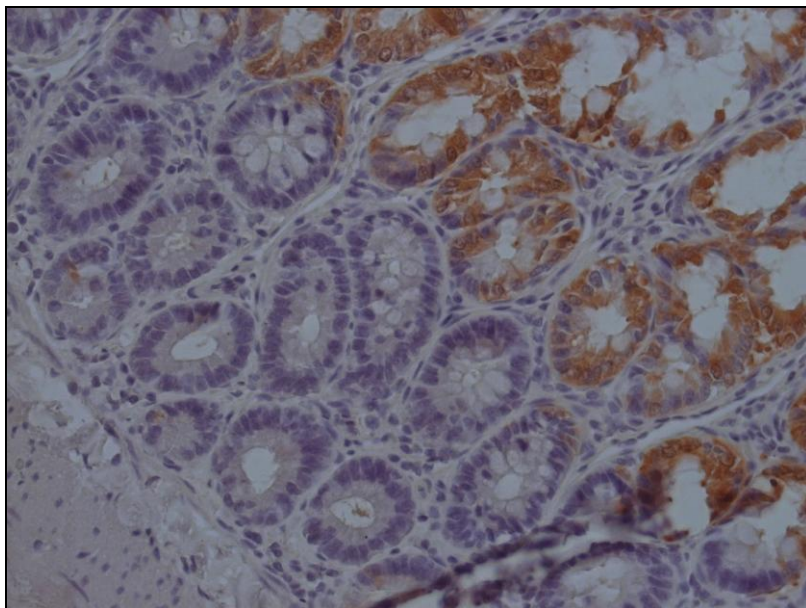


Figura 20: Apoptose nos vilos intestinais, Grupo Belzer, 18 horas de preservação com PCI

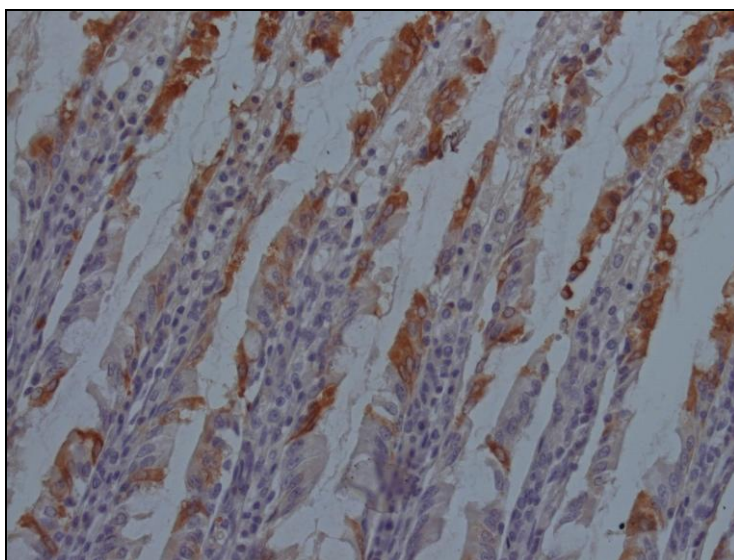


Figura 21: Apoptose nos vilos, intestinais - Grupo Custodiol, 24 horas de preservação com PCI

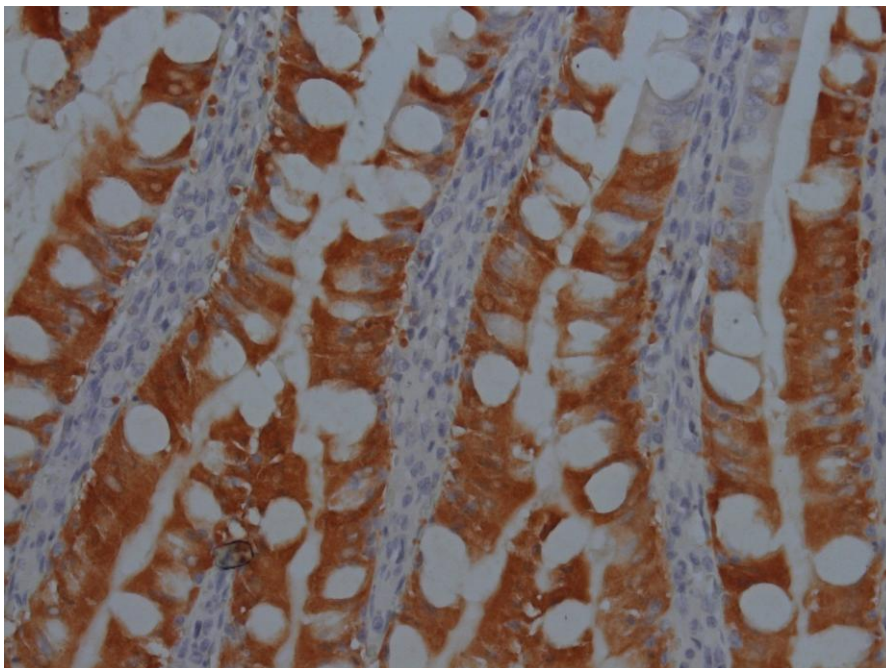


Figura 22: Apoptose nos vilos intestinais, Grupo RL18 horas de preservação sem PCI

5. DISCUSSÃO

5.01 Aspectos Gerais

A integridade morfológica do intestino delgado transplantado é fundamental para o pleno sucesso do TID.

A preservação adequada do enxerto intestinal é uma condição indispensável para prevenir complicações, tais como, a ocorrência de translocação bacteriana e sepsis, a principal causa de mortalidade após transplantes, sendo responsável por aproximadamente 60 a 70 % dos óbitos⁽⁸⁵⁾. Contribuem para esse alto índice de óbito, relacionado à infecção, a presença de germes, próprios do conteúdo intestinal, e a imunossupressão profunda, a que são submetidos os receptores de órgãos⁽²⁾.

Preservação hipotérmica do intestino delgado foi uma das primeiras técnicas utilizadas para se manter a viabilidade do enxerto⁽⁸⁶⁾. Com essa técnica, consegue-se preservar o intestino delgado por cerca de 5 a 8 horas. Procura-se prolongar o período de preservação perfundindo-se e imergindo o enxerto em soluções de preservação resfriada. Especula-se na atualidade se, além da perfusão e imersão, a irrigação do lúmen intestinal, com estas soluções, tem, efetivamente, efeitos na diminuição das lesões isquêmicas^(87,88,89).

O grau das lesões na mucosa intestinal é proporcional ao tempo de isquemia imposto ao órgão^(38,39). Com 10 minutos de hipoxia, geralmente não ocorre alteração; com 15 minutos, observa-se pequena fenda no topo dos vilos (bolhas); aos 30 minutos, ocorre descolamento do epitélio da membrana basal; e, com 60 minutos, a lesão atinge o terço médio dos vilos, sem comprometimento, ainda, das criptas. Este grau de injúria é semelhante ao que ocorre com 16 horas de isquemia hipotérmica. Ao atingir 2 horas de hipóxia, ocorre degeneração em toda a extensão das vilosidades e comprometimento das criptas. É importante salientar que lesões mais profundas na mucosa, correspondente ao grau 6 do escore de Park et al., inviabilizam a potencialidade de regeneração tecidual^(2,40,41,89,90).

Idealmente, o tempo de isquemia fria, com os artifícios de que se dispõe atualmente, não deve suplantiar 10 a 12 horas ⁽⁹⁰⁾.

A hipotermia, fundamental para a preservação, provoca colateralmente um desarranjo nos mecanismos celulares. Os efeitos adversos da hipotermia (edema celular, acidose, e geração exacerbada de radicais livres) ⁽²³⁾ incitaram a busca de meios para minimizá-los, advindo destes estudos a composição de soluções hídricas, formulada com substâncias, cujas propriedades contrapõem os efeitos indesejáveis, característicos do resfriamento tecidual.

As Soluções de Preservação surgiram, portanto, como artifício para minimizar os efeitos colaterais da hipotermia. A Solução de Belzer, formulada na Universidade de Wisconsin (UW), no final dos anos 80 (Viaspan®), revolucionou a preservação de órgãos e ainda é considerada, segundo Oltean ⁽⁹⁰⁾, como padrão-ouro para a preservação de órgãos abdominais. A solução UW tem uma composição denominada 'intracelular' por possuir uma alta concentração de potássio (130mmol/l), contendo também: ácido lactobiônico e rafinose, impermeantes de alto peso molecular, para prevenir edema intracelular secundário à isquemia e à hipotermia; hidroxietil-amido (HES), que lhe confere atividade oncótica, além de glutatona e alopurinol, agentes antioxidantes, introduzidos na solução com o objetivo de atenuar o estresse oxidativo durante reperfusão ^(91,92).

Uma solução de preservação alternativa, que vem sendo avaliada na preservação intestinal, é a Custodiol®, conhecida como *histidine-triptohane-ketoglutarate* (HTK). Semelhante à solução de Belzer-UW, a HTK tem um sistema-tampão, composto por histidina/cloreto de histidina e impermeantes (cetoglutarato), mas, seu conteúdo de eletrólito é semelhante ao meio extracelular (sódio alto e potássio baixo), diferenciando-a da Solução de Belzer. Há evidência crescente sugerindo que os efeitos da solução HTK, em curto prazo, são comparáveis aos resultados da Solução de Belzer para a preservação de fígados e rins; porém, os resultados para a preservação intestinal não são concretos e ainda carecem de estudos para comprovação ^(58,93,94,95,96).

Celsior é outra Solução de Preservação com 'composição extracelular', cuja formulação aparece como um híbrido das duas anteriores. Contém: glutathione reduzida; manitol e ácido lactobiónico, impermeantes de alto peso molecular; elevada concentração de sódio (100 mmol/l) com baixa concentração de potássio, semelhantemente à solução UW, e histidina, que compõe, também, a solução HTK. A Solução Celsior tem se mostrado adequada para preservar os fígados⁽⁹⁷⁾, rins e pâncreas⁽⁹⁸⁾ e seus efeitos na preservação intestinal vêm sendo avaliados. Postula-se que uma solução de preservação ideal deve preservar a estrutura do epitélio intestinal durante o período isquêmico, evitar o edema celular característico da hipotermia, prevenir a lesão tecidual causada por radicais livres de oxigênio e ter componentes com capacidade de gerar os compostos de fosfato de alta energia^(85,90).

Sinteticamente, portanto, pode-se dizer que a hipotermia contribui para diminuir o índice metabólico, levando a um estado de maior tolerância isquêmica e, conseqüentemente, à diminuição na produção de metabólitos tóxicos. Já as Soluções de Preservação impedem a diminuição do pH para valores críticos, contêm nutrientes e substâncias que otimizam a proteção celular, bem como, substratos energéticos. O objetivo final comum é impedir danos irreversíveis à morfologia e à função celular.

Não há, na literatura, referência a uma solução elaborada especificamente para o Intestino Delgado, possivelmente, pela difícil evolução histórica dos TID, que somente nos últimos anos vêm apresentando melhores resultados. Se os TID, historicamente, tivessem obtido bons resultados como os transplantes de Rim, Coração e Fígado, comercialmente teria justificado a investigação e elaboração de uma solução voltada primariamente para o Intestino.

A sobrevivência do enxerto e de pacientes transplantados de Intestino, em 1 ano, está por volta de 80% e, em 5 anos, vem margeando a casa dos 50 a 60%, de acordo com os últimos registros⁽⁹⁰⁾. Atualmente, os estudos apontam para o começo de uma nova era na história do TID, com a melhoria nos resultados, o que, inexoravelmente, levará à busca e a proposições de novas alternativas, visando à melhora na preservação e, conseqüentemente, na integridade e funcionalidade do enxerto.

Adicionalmente à hipotermia e às soluções líquidas, tem-se investigado outros métodos, visando melhorar a preservação. Destaca-se entre estes novos métodos, o condicionamento, que consiste de artifícios realizados previamente à captação. Dentre as várias formas de condicionamento do enxerto, como a irradiação do tecido e o uso de imunossuppressores como FK 506 no pré-operatório⁽⁹⁰⁾, tem ganhado destaque na literatura o PCI, que consiste em submeter o enxerto a ciclos curtos de isquemia e reperfusão, momentos antes da captação. Para esses ciclos, os autores têm estabelecido tempos variados, mas, na maioria dos estudos, o tempo usado fica entre 5 e 10 minutos de isquemia, seguido por igual tempo para reperfusão.

Inúmeros estudos experimentais em ratos têm mostrado que o PCI diminui a intensidade das lesões isquêmicas, quando se compara estes animais com os não submetidos a esse procedimento^(60,61,62,65,66,67,68,69,70). Clinicamente, em cirurgia do Fígado, alguns autores como Clavien et al.⁽⁶³⁾ observaram menor alteração enzimática e menos apoptose das células hepáticas endoteliais nos pacientes submetidos ao PC, previamente às hepatectomias, quando comparados aos que não foram submetidos ao PC. Ficou demonstrado, desse modo, efeito favorável do PC também em cirurgia de fígado.

Os mecanismos, pelos quais age o PCI, ainda não estão totalmente esclarecidos. O que se sabe é que no tecido condicionado há maior manutenção energética nas células, com diminuição da conversão de ATP à hipoxantina e, a partir daí, diminuição na produção dos radicais livres de oxigênio (RLO). Além disso, há um incremento na produção de antioxidantes e na produção de óxido nítrico (NO), que parece ser um dos principais mediadores do processo^(69,70).

Este projeto foi concebido pelo fato de não haver na literatura estudos comparando os efeitos do PCI em associação com as diferentes Soluções de Preservação, na fase de isquemia fria. A maioria dos experimentos avalia o PCI, bem como os efeitos das soluções em situações de isquemia-reperfusão; porém, é importante lembrar que o período isquêmico do TID é crítico e vital para o sucesso do procedimento.

Técnicas e artifícios que beneficiem a preservação, nessa fase, devem ser considerados relevantes, pois há fortes evidências na literatura de que a melhor conservação do enxerto redonda indubitavelmente em melhores resultados, no pós-operatório, e menores índices de rejeição e sepsis.

5.02 Discussão do Método

Para execução deste projeto e para responder à questão proposta nesta pesquisa (“avaliar se a associação do PCI com as Soluções Celsior, Custodiol e Belzer melhora a preservação”), idealizou-se coletar intestino de ratos, com e sem PCI, e submeter tais enxertos à preservação, sob hipotermia nas diferentes soluções, pelo período de 24 horas.

A opção pela utilização de ratos, como doadores dos segmentos intestinais, foi definida devido à praticidade, maior disponibilidade, menor custo e fácil manuseio desses animais. Por estas mesmas razões, a maioria dos estudos com metodologia e objetivos similares a este, também, utilizam ratos. Eventualmente há preferência por outros animais como, por exemplo, porcos e cães ^(68, 72), o que torna os custos mais elevados, com exigência de uma estrutura laboratorial e cirúrgica de maior porte.

Foram formados 4 grupos de 14 animais cada, sendo um deles o grupo controle (RL) e, como esperado (posteriormente confirmado), este grupo apresentou os piores resultados com relação às lesões da mucosa, servindo de parâmetro para comparação com os demais grupos.

O tamanho amostral foi estabelecido após se computar os dados obtidos em estudo-piloto, cujos resultados forneceram os valores que permitiu calcular a magnitude do efeito considerado significativo. Com estes valores, e após as definições quanto aos valores dos erros alfa e beta, foi realizado o cálculo da amostra, que concluiu pela necessidade de incluir, no mínimo, 6 animais em cada grupo. Optou-se por utilizar 7, com objetivo de reforçar o respaldo nos resultados obtidos, tendo-se, entretanto, plena consciência da necessidade do uso racional dos animais de experimentação.

Ressalta-se, também, que esta pesquisa foi conduzida dentro dos absolutos preceitos éticos e em consonância com as normatizações estabelecidas pelo COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Há controvérsias na literatura sobre qual segmento intestinal é mais adequado para transplantação. Balaz et al., em estudo clínico, compararam as injúrias de preservação, nos enxertos de íleo e jejuno, e concluíram que as lesões foram semelhantes⁽³²⁾, denotando, portanto, que, por esta perspectiva, pode ser usado um ou outro. Taguchi et al., em artigo de revisão, relatam que, imunologicamente, o jejuno tem ligeira vantagem sobre o íleo. Porém, funcionalmente, o íleo é considerado melhor em relação a diversos parâmetros, como absorção de gorduras, bile, ácidos, vitaminas, além de possui melhor potencial de adaptação. Esses autores concluíram que estudos aprofundados são necessários para esclarecer esta questão⁽⁹⁹⁾. Experimentalmente, em ratos, Thompson et al. realizaram ressecção de 50% do intestino delgado, seguido de transplante jejunal ou ileal, e observaram maior ganho de peso e maior capacidade de adaptação nos animais transplantados com o íleo⁽¹⁰⁰⁾.

Nesta pesquisa optou-se pela utilização do íleo por estes aspectos funcionais que, possivelmente, o torna fisiologicamente mais apropriado para transplante, embora se saiba da sua vulnerabilidade aos fenômenos imunológicos e à rejeição.

O tempo utilizado para preservação dos enxertos, nos estudos que avaliam as lesões morfológicas do intestino delgado ocorridas entre a captação e o implante, tem sido variado na literatura. O que se pode especular é que, com períodos de isquemia hipotérmica acima de 18 horas, as lesões na mucosa possivelmente ficam mais pronunciadas, já que a hipotermia, associada a algumas soluções, mantém-se a integridade do órgão por 8 a 10 horas⁽³⁹⁾. Portanto, com tempos maiores de isquemia fria, há possibilidade de ocorrer maiores graus de lesão na mucosa, e isso, de certo modo, facilita as interpretações. Além disso, com períodos maiores ou iguais a este, eventuais mecanismos de proteção mostram-se com maior evidência.

Assim, do mesmo modo que autores como Balaz et al.⁽³²⁾, Leuvenink et al.⁽⁵²⁾ e Sileri et al.⁽⁶³⁾, a avaliação das lesões morfológicas do

intestino no presente trabalho foi realizada no decorrer de 24 horas. A avaliação periódica com 12, 18 e 24 horas de preservação é consagrada na literatura^(32, 52, 63) e justifica-se, pela possibilidade da avaliação progressiva das lesões e pelo fato de o agravamento dessas alterações torná-las mais facilmente identificáveis. Naturalmente, a possibilidade de se detectar eventuais mecanismos de proteção amplifica-se, quando as injúrias tendem ao aumento.

Em relação ao PCI, a maioria dos estudos experimentais o realiza com o mesmo método: oclusão temporária da artéria mesentérica superior, seguida de reperfusão pelo mesmo tempo. Alguns estudos diferem, entretanto, quanto ao tempo empregado para os ciclos de isquemia e reperfusão.

Jácome et al.⁽¹⁰¹⁾ realizaram análise morfológica do intestino delgado de ratos submetidos a diferentes períodos de PCI e a igual tempo de isquemia e reperfusão, com interesse de estabelecer o tempo mais adequado para o PCI. Os resultados mostraram que, nos animais com PCI, em ciclos de 15 minutos, não houve diminuição das lesões quando comparado ao grupo em que se realizou apenas isquemia e reperfusão. Entretanto, nos grupos com ciclos de 2, 5, e 10 minutos houve, igualmente, significativa redução das lesões morfológicas. Estes autores concluíram que os ciclos mais curtos, entre 2 e 10 minutos, promovem proteção mais efetiva do intestino. Ressaltam, porém, que estudos funcionais e bioquímicos são necessários para se estabelecer o protocolo adequado para realização do PCI. No presente estudo, optou-se pela realização de ciclos de 10 minutos, tomando por base vários artigos publicados na literatura que o realiza da mesma forma^(67,72), e por entender que este tempo é suficiente para produzir os efeitos correlacionados ao PCI.

Observa-se na literatura a utilização de uma variedade de métodos para avaliar a eficácia das técnicas de preservação do intestino delgado. Dentre estes, um dos parâmetros mais utilizados é a análise, em microscópio, de cortes histológicos de tecido intestinal corados por H.E. Por esse método, procura-se graduar a lesão da mucosa intestinal de acordo com aspectos qualitativos e semiquantitativos⁽¹⁰²⁾. Diferentes escores de graduação da lesão têm sido descritos e não há consenso sobre qual é o mais adequado⁽¹⁰²⁾.

O sistema de graduação ideal é aquele que consegue estabelecer uma correspondência fidedigna entre a aparência morfológica e a intensidade da lesão, mostrando uma proporcionalidade entre a agressão e o escore da lesão.

Sabe-se que a lesão decorrente da isquemia do intestino delgado envolve inicialmente o ápice das vilosidades, promovendo o descolamento das células epiteliais da lâmina própria. Com a permanência do quadro isquêmico, esse descolamento progride, direcionando-se até as criptas, e passa a ocorrer perda de células para a luz intestinal⁽¹⁰³⁾, por apoptose. Os sistemas mais usados para avaliar as lesões são os descritos por Chiu et al.⁽¹⁰⁴⁾ e o proposto por Park et al.^(83,102). Especificamente nos trabalhos mais atuais, em que se avalia a influência das Soluções de Preservação e do PCI na proteção dos enxertos, nota-se que a maioria dos artigos utiliza o escore proposto por Park et al.^(52,53,77,89). Estes autores, em um minucioso estudo experimental, publicado em 1990, realizaram o estrangulamento progressivo da vasculatura do intestino e, paralelamente, realizavam a avaliação microscópica da mucosa, de modo a se observar os graus de progressão da injúria imposta ao órgão. Foi estabelecido por este estudo um escore de lesão, composto de oito níveis, desde o mais brando, com a formação de uma “bolha” no topo das vilosidades, até o mais drástico, caracterizado pelo acometimento profundo da parede intestinal, com infarto transmural e necrose da camada muscular própria da mucosa.

Considera-se na literatura que a análise dos graus de lesão da mucosa é o método “padrão-ouro”, quando se deseja averiguar a eficácia de métodos de preservação⁽³⁹⁾. Desse modo, a ampla maioria dos estudos experimentais, dentro da linha de pesquisa que envolve isquemia e isquemia/reperfusão, a utiliza como a principal variável e a associa com outros parâmetros complementares, como dosagens bioquímicas de lactato⁽⁷⁷⁾ e MDA⁽⁸⁵⁾, além de avaliações imunohistoquímicas⁽²⁸⁾, genéticas⁽⁵⁾ e outras. Neste estudo, a análise dos graus de lesão na mucosa foi considerada inicialmente como a variável preditora e com maior potencial para dirimir a questão da pesquisa.

Foi utilizado o escore de Park et al., portanto, com base nos inúmeros artigos publicados, que apresentaram resultados consistentes

utilizando os mesmos critérios; e, também, por se acreditar que este sistema traduz com fidedignidade o que, de fato, ocorre no âmago do ambiente tecidual dos enterócitos, em circunstâncias iguais a esta proporcionada por este modelo experimental.

Outro parâmetro, frequentemente utilizado para se avaliar os efeitos do PCI e das Soluções de Preservação, é a quantificação de células em apoptose nos vilos. A apoptose é um tipo de morte celular que ocorre durante várias situações fisiológicas e patológicas⁽²⁸⁾, constituindo-se em um mecanismo de remoção de células lesadas, propiciando a renovação celular e tecidual. A morte celular por apoptose é um fenômeno complexo caracterizado por condensação cromatínica, fragmentação do DNA e formação dos corpos apoptóticos⁽¹⁰⁵⁾, sendo que a morte e a proliferação celular estão intimamente relacionadas. Esse processo de perda, queda, e eliminação de células representa um processo ativo, que envolve um colapso celular, e difere, morfologicamente, da morte por necrose, pois, nesta, há ruptura do envoltório celular, exposição citoplasmática e de organelas, migração e concentração leucocitária, caracterizando processo inflamatório e morte celular.

O desprendimento apoptótico e queda dos enterócitos no lúmen, em decorrência da isquemia, durante a preservação, parece ser o principal modo de morte celular na preservação do intestino delgado^(106,107) e, portanto, a contagem do número de células em apoptose constitui-se em um modo prático e objetivo de se avaliar a real situação do tecido, submetido ao processo lesivo, no que concerne a sua perda estrutural. A intensidade da apoptose, representada pelo “índice de células em apoptose” ou “percentual de células em apoptose nos vilos”, é proporcional ao estímulo lesivo e pode ser ou não atenuado por eventuais métodos de proteção^(108,109). Desse modo, espera-se que haja uma correspondência entre a magnitude da perda celular e o estado de conservação do tecido em estudo. A perda de células leva a uma fisiológica renovação estrutural, caracterizada pelo incremento na taxa de proliferação das células-fonte, localizadas na profundidade das criptas intestinais^(110,111,112).

É interessante ressaltar que o processo de proliferação celular, que ocorre em situação de normalidade fisiológica, acontece também em tecidos sob preservação, desde que estes permaneçam viáveis.

Portanto mesmo sob preservação isquêmica hipotérmica, há intensa hiperplasia celular com possível incremento nas taxas de proliferação de células das criptas, apesar do tempo prolongado de isquemia, como o que ocorreu neste experimento.

Várias técnicas podem ser usadas para se detectar a morte celular por apoptose, tais como, TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase deoxyuridine triphosphate nick-end labeling), eletroforese de DNA em agarose, fluorescência em tecidos corados, citometria de fluxo e técnicas imunohistoquímicas com utilização de anticorpos anti-caspase-3, que são as mais utilizadas, atualmente⁽¹¹³⁾.

Quanto à proliferação celular, também se dispõe de inúmeros métodos para sua avaliação. Dentre as várias técnicas, as mais frequentemente utilizadas na atualidade são as imunohistoquímicas, tais como BrdU (5-bromo-2deoxi-uridine), Ki67 (antígeno nuclear, descoberto em Kiel-Alemanha) e PCNA (antígeno nuclear de proliferação celular)^(113,114,115).

O processo de destruição da membrana celular pelos radicais livres de oxigênio (RLO), que ocorre em tecidos sob *stress* isquêmico e oxidativo, é denominado lipoperoxidação (LPO). Esse processo resulta de uma reação em cadeia, mediada pelos RLO, resultando na deterioração oxidativa dos ácidos graxos poli-insaturados (PUFAS), que são os principais componentes da dupla camada lipídica que compõem a membrana celular. Os PUFAS são extremamente vulneráveis na presença dos RLO, resultando na formação dos hidroperóxidos que são metabolizados em aldeídos, e, entre estes, o MDA. Esta molécula pode ser dosada nos diversos tecidos e líquidos orgânicos, por diversas técnicas, e se constitui em um marcador da lesão oxidativa induzida por isquemia e, especialmente, por isquemia e reperfusão.

As alterações nos níveis de MDA são mais presentes e mais observadas no momento da reperfusão, tendo relação direta com a presença de substâncias oxidantes despejadas na circulação nesse instante; porém, mesmo em tecidos sob preservação isquêmica há produção de RLO e alguns

autores, como Ferencz et al.⁽⁶⁸⁾, adotaram a análise do MDA intestinal como um dos parâmetros para avaliar o tecido, sob preservação hipotérmica. Esse fato, inclusive, é a justificativa pela presença de substâncias antioxidantes, como a glutathione, em algumas Soluções de Preservação.

Nesta pesquisa, apesar de não ter havido reperfusão prolongada, apenas pelo período de 10 minutos fazendo parte do PCI, foi realizada a dosagem do MDA, como complemento da avaliação das lesões celulares, realizada por outros parâmetros.

5.03 Discussão dos Resultados

Os resultados da dosagem do MDA nos grupos sem PCI, com Zero hora de preservação, não mostrou diferença estatisticamente significativa. Com 12, 18 e 24 horas, o Grupo Controle (RL), de um modo geral, apresentou valores do MDA significativamente superiores aos demais Grupos. Isso denota que a lipoperoxidação (LPO) foi mais intensa, como era esperado nestes segmentos ileais, já que a solução de Ringer, na realidade, não possui composição apropriada para conservação tecidual, e, possivelmente, os efeitos que eventualmente tenham sido observados neste Grupo devem-se exclusivamente à hipotermia. Praticamente, a totalidade dos estudos formulados com objetivo de avaliar Soluções de Preservação, em que se utilizou Ringer^(56,57) ou Solução Fisiológica em Grupos Controle, os resultados da dosagem do MDA foram piores nestes.

Deve-se destacar, ainda, que as soluções Celsior e Belzer contêm o antioxidante glutathione em sua formulação, e isso, possivelmente, deve ter diminuído a LPO da membrana celular nesses Grupos. Ao se efetuar o PCI, observou-se queda nos valores do MDA em todos os Grupos, com exceção do período de Zero hora nos grupos RL e Celsior, bem como, no período de Zero e 18h do Grupo Custodiol. Não se realizou neste estudo, entretanto, a comparação entre os Grupos sem e com PCI, pois esse comparativo foge aos objetivos deste trabalho; ademais, a influência do PCI, nas lesões de isquemia/reperfusão e na isquemia propriamente dita, está bem estabelecida na literatura^(62,63,65,67).

É interessante frisar que a associação do PCI e as Soluções Celsior e Belzer com 12 horas de preservação tiveram resultados melhores, com valores menores de MDA, do que os Grupos RL e Custodiol. Desse momento em diante a Solução de Belzer passa a apresentar menores índices de MDA que as demais, porém sem significância estatística, e as Soluções Celsior e Custodiol apresentam praticamente os mesmos valores (Gráfico 2).

Ferencz et al.⁽¹¹⁶⁾, avaliando a influência do PACAP (Pituitary Adenylate Cyclase–Activating Polypeptide), um peptídeo endógeno com alta concentração no jejuno e íleo, nas lesões intestinais, durante a preservação hipotérmica intestinal por 6 horas, usaram o MDA (micromol/g de tecido) como um dos parâmetros e observaram, também, aumento do malondialdeído com a progressão do período de preservação. Estes mesmos autores, em artigo publicado anteriormente⁽⁷²⁾, já tinham demonstrado que o PCI diminui o *stress* oxidativo e, conseqüentemente, os níveis de MDA intestinal, em TID experimental em cães. Cine et al.⁽¹¹⁷⁾, avaliando, em intestino de ratos, os efeitos do PCI, observaram diminuição da apoptose e do MDA intestinal nos animais submetidos ao PCI. Não se encontrou na literatura pesquisada, para elaboração deste trabalho, estudos comparando valores do MDA em enxertos submetidos ao PCI e preservados sob hipotermia em diferentes Soluções. A maioria dos autores faz a dosagem desta substância para avaliar o *stress* oxidativo, em estudos cujo foco principal é a avaliação de lesões por isquemia e reperfusão.

A análise dos graus de lesão da mucosa intestinal nas amostras com Zero hora de preservação, nos grupos sem PCI, não evidenciou diferenças estatisticamente significativas; porém, ao se realizar o PCI, os Grupos Celsior, Custodiol e Belzer passaram a ter graus de lesões menores que o Grupo-Controle (RL). Com 12 horas de preservação, nos intestinos sem PCI, os 3 grupos de estudo também apresentaram igualdade na gravidade das lesões, mas, ao se realizar o PCI, os Grupos Celsior e Belzer passaram a apresentar menor escore de lesões do que o do RL e do Custodiol.

Com 18 horas de preservação, nos intestinos sem PCI, as Soluções Celsior e Belzer também tiveram resultados iguais, com lesões

menos pronunciadas do que as dos Grupos cujo íleo foi preservado com as outras Soluções. Com a realização do PCI, o Grupo RL apresentou escore de lesão semelhante ao Grupo Custodiol, e ambos, maiores graus de lesões do que os demais Grupos.

Ao se atingir as 24 horas de preservação, continuou ocorrendo a progressão na gravidade das lesões; no entanto, os Grupos mantiveram o mesmo padrão e a mesma proporcionalidade na intensidade destas injúrias. Os Grupos Celsior e Belzer mantêm melhores resultados. Com a realização do PCI, ocorreu diminuição global das lesões, porém, o Grupo Custodiol permanece apresentando maior grau de lesão do que o Celsior e o Belzer. A alteração observada nos Grupos, nessa fase, foi com o Custodiol, que passou a superar o RL, apresentando lesões menos graves.

Vários estudos na literatura, que avaliaram os efeitos do PCI, apresentam resultados semelhantes a este, que evidenciou, praticamente em todas as fases, diminuição na progressão das lesões em intestinos preconditionados^(62,65,73,75).

Deve-se salientar que, em todos os Grupos, em nenhum dos segmentos intestinais coletados, foi observado grau de lesão máxima, de acordo com os critérios propostos para este experimento⁽⁸³⁾.

A avaliação morfológica da mucosa, pelos vários métodos disponíveis, constitui-se no parâmetro mais usado para se averiguar a qualidade dos enxertos sob preservação hipotérmica. Praticamente, todos os estudos com esse objetivo a utilizam como a variável primária⁽⁵⁷⁾. Assim Balaz et al. ⁽⁵³⁾, comparando os efeitos das Soluções Belzer e Custodiol na preservação intestinal hipotérmica por 12 horas, utilizaram o grau de lesão e a concentração de serotonina na mucosa, como parâmetros, e concluíram que a Solução de Belzer possui melhor efeito protetor. Tesi et al, em estudo clínico⁽³⁹⁾, avaliando alterações histopatológicas em intestino delgado preservado em Viaspan® (Solução de Belzer), concluíram que o órgão mantém-se com o aspecto morfológico próximo da normalidade pelo período de 6 horas, e que, a partir da nona hora de isquemia hipotérmica, presenciavam-se lesões mais graves na mucosa, com amplo descolamento da camada

epitelial. Esses autores recomendam, inclusive, que o tempo de isquemia não deve ultrapassar este período.

A quantificação do índice de apoptose nas vilosidades intestinais mostrou que, com Zero hora de preservação, tanto nos Grupos sem, quanto nos com PCI, não houve diferença estatística significativa entre as Soluções de Preservação, nem mesmo em relação à Solução Controle (RL).

No período seguinte, 12 horas de hipotermia, nos grupos sem PCI, as Soluções Ringer e Custodiol foram menos eficientes e apresentaram maior índice de apoptose quando comparados ao Grupo Belzer, que, por sua vez, apresentou resultados semelhantes ao Grupo Celsior. Quando se realizou o PCI, houve diminuição geral de apoptose em todos os Grupos; porém, as Soluções Ringer e Custodiol mantiveram resultados piores, com maior perda de células para a luz intestinal.

Ao se atingir 18 horas de preservação, os Grupos tiveram o mesmo padrão global dos resultados que ocorreram no período anterior. Como esperado, houve progressão geral do número de células apoptóticas, porém, observa-se diminuição destas, quando se preconditiona o tecido intestinal.

Ao final do período de preservação isquêmica hipotérmica do intestino delgado, proposto para este experimento, nos Grupos não submetidos ao PCI, a Solução Ringer permaneceu apresentando-se menos eficaz na proteção dos enxertos, com índices percentuais de apoptose superior aos outros três Grupos. Observou-se na análise final da apoptose, com 24 h de preservação, que, ao se realizar o PCI, a Solução Custodiol mantém melhores resultados em relação à Ringer; porém, passa a apresentar percentuais maiores de apoptose em relação às outras Soluções.

Inúmeros estudos vêm mostrando que o PCI tem efeitos benéficos quando se avalia a apoptose. Aban et al⁽⁷⁴⁾, por exemplo, avaliaram experimentalmente os efeitos do PCI, concluindo que ocorre diminuição da apoptose celular quando se realiza este procedimento. Alguns autores têm evidenciado, também, que o PCI, além de diminuir a apoptose, diminui a ocorrência de translocação bacteriana⁽¹⁰³⁾, o que poderia ter impacto favorável na diminuição da mortalidade por sepse, nos pacientes submetidos ao TID.

No presente experimento, observou-se progressão no percentual dos índices de apoptose à medida que se estendia o tempo de preservação e, de modo igual a outras variáveis, percebe-se diminuição nos índices, nos enxertos submetidos ao PCI.

Outros experimentos, como por exemplo o realizado por Guimarães ⁽¹¹⁸⁾, mostraram, através da imunohistoquímica, com a quantificação da apoptose pela técnica da TUNEL e a proliferação celular pelo PCNA, que, além do PCI, outros artifícios, como a oxigenação hiperbárica, incrementam a proliferação celular e diminuem a apoptose no intestino.

Em relação à avaliação dos efeitos das Soluções de Preservação na proteção de enxertos, há um número vasto de artigos ^(23,24,41,48,49,50,52,54,55,57,79,93,94) e os resultados são controversos.

Straatsburg, et al. ⁽¹¹⁹⁾ avaliaram apoptose e necrose em fígado de ratos após preservação hipotérmica e concluíram que Celsior e UW foram mais efetivas que HTK. Wei et al. ⁽³³⁾ investigaram os efeitos de uma nova solução, a Polysol, na preservação intestinal, e concluíram que esta nova solução foi superior à HTK e à Celsior, sendo estas duas superiores a UW. Mangus et al. ⁽⁵⁸⁾, em estudo clínico em que se comparou HTK e Belzer em transplante intestinal e multivisceral, avaliaram a sobrevivência de pacientes, a função do enxerto e rejeição, não observando diferença entre as soluções. Possivelmente, experimentos realizados com metodologias meticulosamente semelhantes teriam maior probabilidade de apresentar resultados mais homogêneos.

Os resultados deste estudo, no que se refere à qual solução isoladamente apresenta melhores efeitos na proteção do intestino delgado, assemelham-se aos resultados obtidos por alguns autores ⁽¹¹⁹⁾, que, estudando parâmetros como apoptose e escores de lesão de mucosa, observaram melhores resultados com as Soluções Belzer e/ou Celsior. Alguns, inclusive, manifestam-se enfaticamente favoráveis à Solução de Belzer, colocando-a como “solução-padrão” na preservação de órgãos abdominais. Mas, na realidade, estamos distantes de um consenso. No modelo experimental e metodológico proposto e executado nesta pesquisa, as Soluções Celsior e Belzer apresentaram resultados bastante semelhantes, em desfavor da

Custodiol que, em determinadas situações, apresentou resultados que se assemelharam à Solução Controle.

Com referência ao PCI, cujos efeitos benéficos na preservação de fígado, intestino e outros órgãos estão amplamente respaldados, o presente estudo obteve resultados compatíveis com os que são apresentados na literatura. Praticamente em todas as variáveis estudadas, o PCI incrementou positivamente os efeitos das Soluções de Preservação. Este artifício, portanto, de acordo com estes resultados, pode ser considerado como um adjuvante importante no incremento da qualidade de preservação do intestino delgado.

A aplicação clínica desta técnica, pela simplicidade de sua execução, poderá ser avaliada e implementada, na medida em que os transplantes intestinais se difundam com maior amplitude. Isso consequentemente, proporcionará: novas situações, novos desafios, captação de órgãos com características variadas, pacientes nas mais diversas circunstâncias, suscitando, em momentos oportunos, o emprego de novas técnicas, como esta, já amplamente respaldadas em estudos experimentais.

No que se refere à associação do PCI com as Soluções, observou-se que as melhores soluções, quando associadas ao PCI, ganham um efeito adicional, que redundará em melhor proteção ao intestino, colocado diante destas situações extremas de isquemia e hipotermia. É patente que os mecanismos pelos quais age o PCI ainda não estão completamente esclarecidos e não há definição na literatura sobre qual tipo de Solução de Preservação é ideal para o Intestino Delgado e, portanto, novos estudos são necessários. Nesta temática, este experimento contribuiu no sentido de mostrar quais as Soluções que se apresentam como as melhores opções para manter a integridade da mucosa intestinal durante a fase de isquemia hipotérmica.

Possivelmente, uma conjunção de técnicas, que envolvam perfusão vascular da Solução de Preservação, condicionamento através de ciclos de isquemia/reperfusão, imunossupressão prévia do doador e infusão luminal das soluções, possa melhorar a preservação deste sensível e vital segmento do trato digestivo.

Segundo Ueno & Fukuzawa, para melhorar a sobrevivência a longo prazo e a qualidade de vida para pacientes que receberam TID, necessita-se de avanços na técnica cirúrgica, de novos imunossupressores, de

melhoria nos cuidados pós-cirúrgicos e refinamento na selecção dos candidatos a transplante ⁽¹²⁰⁾.

A perspectiva é a de que o TID seja indicado, rotineiramente, como uma terapia-padrão para pacientes com falência intestinal.

6. CONCLUSÕES

1. A associação do condicionamento isquêmico com as Soluções de Preservação Celsior e Belzer teve melhores efeitos na proteção do intestino delgado
2. As Soluções Celsior e Belzer apresentaram efeitos semelhantes e superiores ao Ringer-Lactato e ao Custodiol na proteção da morfologia intestinal, quando utilizadas isoladamente.

7. ANEXOS

Valores gerais dos resultados das análises das variáveis em todos os Grupos sem e com PCI.

7.01 Resultados gerais da dosagem do MDA

TABELA 9: Resultados da dosagem do MDA em nmol/mg de tecido no Grupo Ringer, sem e com condicionamento isquêmico nos 7 animais, com zero, 12, 18 e 24 horas de preservação

GRUPO RINGER								
Animal	Zero		Doze		Dezoito		V. quatro	
	Sem	com	sem	com	sem	com	sem	com
1	1,49	1,14	2,34	2,47	2,21	4,81	4,82	6,06
2	2,77	3,34	3,10	3,81	3,27	3,16	2,96	4,79
3	1,10	4,03	5,31	2,79	4,40	5,98	4,68	3,18
4	2,90	1,76	4,78	2,77	5,46	2,01	5,86	2,00
5	3,12	3,25	2,70	2,29	4,98	3,42	2,92	3,31
6	2,80	3,29	3,80	4,58	7,29	5,32	4,40	2,80
7	2,64	3,31	2,91	3,46	3,20	5,63	3,81	5,50
X±DP	2,40±0,7	2,87±1,0	3,56±1,1	3,17±0,8	4,40±1,6	4,33±1,4	4,21±1,0	3,95±1,5

an=Animais

sem pci=sem condicionamento isquêmico

com pci=com condicionamento isquêmico

X=média DP=desvio padrão

TABELA 10: Resultados da dosagem do MDA em nmol/mg de tecido no Grupo Celsior, sem e com condicionamento isquêmico nos 7 animais com zero,12,18 e 24 horas de preservação

GRUPO CELSIOR								
Animal	Zero		Doze		Dezoito		V. quatro	
	sem pci	com pci	sem pci	com pci	sem pci	com pci	sem pci	com pci
1	1,76	1,22	2,91	2,77	4,54	4,81	5,34	2,43
2	2,13	2,72	5,60	1,35	4,77	3,16	3,12	3,36
3	0,94	1,09	2,13	2,81	3,29	5,98	3,73	1,09
4	0,64	0,56	1,35	0,78	3,83	2,01	1,58	2,14
5	0,26	2,42	0,99	1,20	1,87	3,42	1,18	1,98
6	2,60	0,82	2,35	2,68	4,85	5,32	3,73	1,60
7	2,31	2,20	0,97	1,80	1,33	5,63	4,15	2,94
X±DP	1,52±0,9	1,58±0,8	2,33±1,6	1,92±0,8	,50±1,4	3,14±0,8	3,26±1,4	2,22±0,7

an=Animais

sem pci=sem condicionamento isquêmico

com pci=com condicionamento isquêmico

X±DP=média e desvio padrão

TABELA 11: Resultados da dosagem do MDA em nmol/mg de tecido no Grupo Custodiol, sem e com condicionamento isquêmico nos 7 animais com zero,12,18 e 24 horas de preservação

GRUPO CUSTODIOL								
Animal	Zero		Doze		Dezoito		V. quatro	
	sem pci	com pci	sem pci	com pci	sem pci	com pci	sem pci	com pci
1	2,92	2,35	2,58	2,46	2,93	3,78	3,46	1,05
2	1,64	4,62	3,64	1,73	2,10	3,72	0,91	2,29
3	2,39	2,13	1,46	2,84	1,73	2,96	1,18	1,70
4	2,95	3,55	3,23	3,65	1,36	2,61	2,47	3,41
5	0,90	2,14	1,57	2,73	2,37	2,63	2,90	2,50
6	2,46	1,10	4,04	3,43	3,13	2,20	1,01	1,90
7	2,80	4,14	4,29	2,80	3,00	3,30	2,25	1,84
X±DP	2,30±0,7	2,86±1,2	2,97±1,1	2,81±0,6	2,37±0,6	3,03±0,5	2,03±1,0	2,10±0,7

an=Animais

sem pci=sem condicionamento isquêmico

com pci=com condicionamento isquêmico

X±DP=média e desvio padrão

TABELA 12: Resultados da dosagem do MDA em nmol/mg de tecido no Grupo Belzer, sem e com condicionamento isquêmico nos 7 animais com zero,12,18 e 24 horas de preservação

GRUPO BELZER								
Animal	Zero		Doze		Dezoito		V. quatro	
	sem pci	com pci	sem pci	com pci	sem pci	com pci	sem pci	com pci
1	1,56	2,32	2,67	2,00	4,15	3,90	2,44	0,3
2	2,10	1,82	1,45	1,90	3,24	1,70	1,46	2,1
3	1,04	1,09	1,84	2,20	3,91	2,29	3,09	0,73
4	0,74	0,66	0,78	1,35	1,89	1,85	3,14	2,0
5	0,56	1,62	1,19	0,99	2,09	1,87	2,98	1,18
6	2,60	0,92	2,78	2,15	2,01	2,25	2,60	2,80
7	2,36	2,22	1,75	0,97	2,21	2,33	1,94	1,15
X±DP	1,57±0,8	1,52±0,6	1,78±0,7	1,65±0,5	2,79±0,9	2,31±0,7	2,52±0,6	1,47±0,8

an=Animais

sem pci=sem condicionamento isquêmico

com pci=com condicionamento isquêmico

X±DP=média e desvio padrão

7.02 Resultados gerais das análises do grau de lesão da mucosa

TABELA 13 - Grau de lesão da mucosa nos grupos Ringer, Celsior, Custodiol e Belzer sem e com condicionamento isquêmico nos quatro períodos (zero, 12, 18 e 24 horas de preservação)

an	RINGER		CELSIOR		CUSTODIOL		BELZER	
	sem pci	com pci	sem pci	com pci	sem pci	com pci	sem pci	com pci
1	0-4-5-6	1-3-4-6	1-3-4-5	0-2-2-3	1-3-4-4	1-2-3-4	1-2-5-5	0-2-2-4
2	1-4-6-6	0-4-4-6	0-2-3-3	0-1-2-3	1-2-3-5	0-2-3-6	0-2-3-3	0-1-2-3
3	1-5-5-7	2-3-4-7	1-1-3-4	0-1-5-5	1-4-5-5	1-3-4-5	1-1-3-4	0-1-3-5
4	2-4-5-7	1-4-5-7	0-2-3-3	0-2-2-4	0-3-5-6	0-3-5-5	0-2-3-3	0-2-2-4
5	1-3-5-6	2-3-4-6	1-3-3-4	0-1-2-3	1-2-4-5	1-2-3-5	1-3-3-4	0-1-2-3
6	1-4-6-7	1-3-5-7	1-3-4-5	0-1-3-4	1-4-5-7	0-3-4-5	0-3-4-4	0-2-3-4
7	2-4-6-7	0-4-5-6	0-2-3-4	1-2-2-3	1-3-5-7	1-2-4-5	0-2-3-4	1-2-2-3

an=Animais (0-12-18-24 h. de preservação)

sem pci=sem condicionamento isquêmico

com pci=com condicionamento isquêmico

7.03 Resultados gerais do percentual de apoptose nas vilosidades intestinais

TABELA 14: Resultados da quantificação percentual do índice de apoptose celular nas vilosidades intestinais no Grupo Ringer, sem e com condicionamento

GRUPO RINGER								
an	Zero		Doze		Dezoito		V. quatro	
	sem pci	com pci	sem pci	com pci	sem pci	com pci	sem pci	com pci
1	2	1	4	6	11	9	34	24
2	3	1	5	2	13	7	48	29
3	2	2	7	5	10	6	27	27
4	3	2	4	2	15	10	39	20
5	2	1	7	5	14	7	29	27
6	2	-	5	1	17	8	33	23
7	2	2	4	3	12	11	37	24
X ± DP	2,2 ± 0,4	1,5±0,5	5,1±1,3	3,4±1,9	13,1±2,4	8,9±1,7	35,2±6,9	24,2±3,5

an=Animais

sem pci=sem condicionamento isquêmico

com pci=com condicionamento isquêmico

X±DP=média e desvio padrão

TABELA 15: Resultados da quantificação percentual do índice de apoptose celular nas vilosidades intestinais no Grupo Celsior, sem e com condicionamento

GRUPO CELSIOR								
An	Zero		Doze		Dezoito		V. quatro	
	sem pci	com pci	sem pci	com pci	sem pci	com pci	sem pci	com pci
1	2	1	2	1	7	5	17	10
2	3	2	4	2	6	3	13	9
3	1	0	2	1	4	2	14	11
4	2	1	3	1	8	2	16	10
5	1	1	5	3	9	4	28	18
6	3	1	3	1	10	2	15	12
7	2	1	3	2	8	3	24	15
X±DP	2,0 ±0,8	1,0±0,5	3,1±1,0	1,5±0,7	7,4±1,9	3,0±1,1	18,1± 5,6	12,1± 2,2

an=Animais

sem pci=sem condicionamento isquêmico

com pci=com condicionamento isquêmico

X±DP=média e desvio padrão

TABELA 16: Resultados da quantificação percentual do índice de apoptose celular nas vilosidades intestinais no Grupo Custodiol, sem e com condicionamento

GRUPO CUSTODIOL								
Animal	Zero		Doze		Dezoito		V. quatro	
	sem pci	com pci	sem pci	com pci	sem pci	com pci	sem pci	com pci
1	2	1	5	4	9	5	26	18
2	3	2	3	2	13	4	27	19
3	4	2	-	2	10	5	23	17
4	2	1	7	4	15	6	20	18
5	3	2	6	5	10	3	29	15
6	1	0	4	3	14	8	25	22
7	2	1	2	3	11	7	22	19
X±DP	2,4±0,9	1,2±0,7	4,5±1,8	3,2±1,1	11,7±2,2	5,4±1,7	24,5±3,1	18,2±2,1

an=Animais

sem pci=sem condicionamento isquêmico

com pci=com condicionamento isquêmico

X±DP=média e desvio padrão

TABELA 17: Resultados da quantificação percentual do índice de apoptose celular nas vilosidades intestinais no Grupo Belzer, sem e com condicionamento

GRUPO BELZER								
Animal	Zero		Doze		Dezoito		V. quatro	
	sem pci	com pci	sem pci	com pci	sem pci	com pci	sem pci	com pci
1	1	1	2	1	7	4	17	10
2	3	2	3	1	6	5	13	11
3	1	0	1	1	4	2	24	19
4	2	1	3	1	7	3	-	-
5	1	0	2	2	9	2	18	10
6	1	0	1	1	10	2	15	15
7	3	3	3	2	8	3	14	10
X±DP	1,7±0,9	1,0±1,1	2,1±0,9	1,2±0,4	7,2±1,9	3,0±1,1	16,8±3,9	12,5±3,7

an=Animais

sem pci=sem condicionamento isquêmico

com pci=com condicionamento isquêmico

X±DP=média e desvio padrão

8. REFERÊNCIAS

1. Fishbein TM. Intestinal Transplantation. The New England Journal of Medicine 2009; 361(10): 998-1008.
2. Oltean M, Joshi M, Herlenius G, Olausson M. Improved Intestinal Preservation Using an Intraluminal Macromolecular Solution: Evidence from a rat model. Transplantation 2010; 89: 285-290.
3. Balaz P, Matia I, Jackanin S, Pomfy M, Fronek J, Ryska M. Morphological changes of small bowel graft in wistar rats after preservation injury. Bratisl Lek Listy 2004; 105: 62-64.
4. Froník J, Ďivný P, Vávrová J, Ryska M. Preservation injury of the small bowel graft in rats. Eur Surg 2006; 38 (6): 439–444.
5. Wang SF, Liang Q, Li GW, Gao K. Gene expression profile in rat small intestinal allografts after cold preservation-reperfusion. World J Gastroenterol 2005; 11(6): 885-889.
6. Neves JS. Influência da glutamina associada ou não a ácidos graxos de cadeia curta na adaptação do intestino delgado de ratos submetidos à enterectomia extensa [tese de mestrado]. Cuiabá (MT): Universidade Federal de Mato Grosso, 2002.
7. Benedetti E, Holterman M, Asolati M, Domenico SD, Oberholzer J, Sankary H, Abcarian H, Testa G. Living related segmental bowel transplantation: From experimental to standardized procedure. Ann Surg 2006; 244: 694–699.
8. Middleton SJ. Is intestinal transplantation now an alternative to home parenteral nutrition? Proceedings of the Nutrition Society 2007; 66: 316–320.

9. Langer RM, Kahan BD. Alexis Carrel's Legacy: Visionary of vascular surgery and organ transplantation. *Transplantation Proceedings* 2002; 34:1061–1065.
10. Lillehei R, Goott B, Miller F. The physiological response of the small bowel of the dog to ischemia including prolonged in vitro preservation of the bowel with successful replacement and survival. *Ann Surg* 1959; 150: 543–560.
11. Monchik CJ, Russell PS. Transplantation of small bowel in the rat: Technical and immunological considerations. *Surgery* 1971; 70: 693–702.
12. Goffi FS, Fugimura I, Tolosa EMC, Lemos PCP, Behmer AO, Freitas AG, Carnevale J, Nakashima Y. Ensaio experimental sobre transplante heterólogo de Intestino delgado. *Rev. Paul. Med.* 1971; 77:57:62.
13. Greenstein SM, Friedmann JC, Prowse O. Intestinal transplantation. <http://www.medscape.com/public/copyright>. Updated: Jan 14th, 2009.
14. Lillehei RC, Idezuki Y, Freemster JA, Dietzsch RH, Kelly WD, Merkel FK, Goetz FC, Lyons GW, Manax WG. Transplantation of stomach, intestine and pancreas: Experimental and clinical observation. *Surgery* 1967; 62:721-41.
15. Okumura M, Fujimura I, Ferrari A, Nakini K, Lemos PCP, Andréa EA, Bahdur R, Marek SR, Yasbek-Neto MJ, Posso BJM, Fonseca AM, Iriya K, Antonascio F, Faria JP, Magaldi JB, Paula W, Raia AA. Transplante de intestino delgado: Apresentação de um caso. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo*, 1969; 24:39-41
16. Alicam F, Hardy JD, Cayirli M, Varmer JE, Moynihan PC, Turner MD, Anas P. Intestinal transplantation: Laboratory experience and reports of clinical case. *Am. J. Surgery* 1971; 121: 150-159.

17. Fortner JG, Sichuk G, Litwin SD, Beatle JR. Immunological response to an intestinal allograft with HLA-identical donor recipient. *Transplantation* 1972; 14: 531-5.
18. Todo S, Tzakis AG, Abu-Elmagd K. Intestinal transplantation in composite visceral grafts or alone. *Ann Surg* 1992; 216 (3): 223-233.
19. Kino T, Hatanaka H, Miyata S. A novel immunosuppressant isolated from streptomycetes, II: Immunosuppressive effect of FK-506 in vitro. *Journal of Antibiotics* 1987, sept; 40(9): 1249-1255.
20. Deltz E, Schroeder P, Gundlach M, Hansmann ML, Leimenstoll G. Successful clinical small-bowel transplantation. *Transplantation Proceedings* 1990; 22:2501-2514.
21. Goulet O, Revillon Y, Brousse N, Jan D, Canion D, Rambaud C, Cerf-Bensussan N, Buisson C, Hubert P, De Potter S, Mougnot JF, Fischer A, Ricour C. Successful small bowel transplantation in an infant. *Transplantation* 1992; 53: 940.
22. Silva RF, Paula AC, Arroyo PC Jr, Gonzalez AM, Marchini JS, Duca WJ, Faria WL, Rocha MF, Felicio HCC, Abbud-Filho M, Silva RCMA. Report of initial experience in small bowel transplantation at São José do Rio Preto Medical School Hospital. *Transplantation Proceedings* 2008; 40: 827–829.
23. Maathuis MH, Leuvenink HG, Ploeg RJ. Perspectives in organ preservation. *Transplantation* 2007; 83(10):1289-1298.
24. Jamieson RW, Friend PJ, Organ reperfusion and preservation. *Front Biosci* 2008; 1(13):221-235.

25. Tzakis A, Todo S, Reyes J, Nour B, Abv Elmagd K, Furukawa H, Kadry Z, Bron K, Starzl TE. Evolution of surgical techniques in clinical intestinal transplantation. *Transplant Proc* 1994;26:1407-408.
26. Tzakis AG, Selvaggi G. Small bowel transplantation: Technical advances/updates *Curr Opin Organ Transpl* 2009; 14(3):262–266.
27. Montero EFS, Steffens VA, Manna MCB, Koike M K, Saldanha CEA, Oliveira KF, Simões MJ. Allogeneic acute rejection on fetal small-bowel graft: Role of gangliosides. *Microsurgery* 2006; (26): 58-60.
28. Lee ADW, Gama-Rodrigues JG, Waitzberg DL. Participação da apoptose na rejeição aguda do transplante intestinal em ratos. *Arq. Gastroenterol* 2004; (41)3:49-52.
29. Fryer JP. The current status of intestinal transplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation* 2008;13: 266-272.
30. Aguilar-Nascimento JE, Marques CG, Mariano AC, Salomão AB, Neves JS. Benefits of intraluminal injection of glutamine for intestinal mucosa during ischemia-reperfusion. *Eur Surg Res* 2003; 35: 352-356.
31. Olson DW, Jijon H, Madsen KL, Al-Saghier M, Zeng J, Jewel LD, Bigan DL, Churchill TA. Human small bowel storage: The role for luminal preservation solutions. *Transplantation* 2003; 76:709-712.
32. Balaz P, Kudla M, Lodererova A, Oliverius M, Adamec M. Preservation injury to the human small bowel graft: Jejunum vs. ileum. *Ann Transplant* 2007;12(1):15-18.

33. Wei L, Hata K, Doorscho'dt BM, Büttner R, Minor T, Tolba RH. Experimental small bowel preservation using polysol: A new alternative to University of Wisconsin solution, celsior and histidine-tryptophan-ketoglutarate solution. *World J Gastroenterol* 2007; 13(27): 3684-3691.
34. Silva Jr OC, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, Oliveira AF, Dal Sasso K. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. *Acta Cirúrgica Brasileira* 2002; 17 (Suplemento 3).
35. Cerqueira NF, Hussni CA, Yoshida WB. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: A review. *Acta Cir Bras*. [serial online] 2005 Jul-Aug;20(4).
36. Ribeiro ME, Yoshida WB. Reperfusion injury after intestinal ischemia: Pathophysiology and experimental models. *J Vasc Br* 2005; (4) 2:183-194.
37. Dorweiler B, Pruefer D, Andrasi TB, Maksan SM, Walther Schmiedt W, Neufang A, Vahl CF. Ischemia-reperfusion injury pathophysiology and clinical implications. *Eur J Trauma Emerg Surg* 2007; 33:600-612.
38. Ribeiro MAF, Montero EFS, Piva AM, Gualberto E, Nigro AJT, Taha MO, Soucar C, Lapa AJ, Venco FE: Histopathologic changes in rat small intestine during storage in UW or celsior solution with or without a 21-aminosteroid (U74389G) after 12, 18, and 24 hours. *Transplant Proc* 2000; (32):1261-1264.
39. Tesi R, Jaffe B, McBride V, Haque S. Histopathologic changes in human small intestine during storage in viaspan organ preservation solution. *Arch Pathol Lab Med* 1997; (121): 714-718.
40. Schoenberg MH, Berger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21:1376-1386.

41. Galvão FHF. Comparação entre as soluções da Universidade de Wisconsin e Euro-Collins na preservação hipotérmica do Intestino Delgado: Estudo experimental em ratos. Tese de Mestrado em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP, 1992.
42. Palmer R. The history of organ perfusion and preservation. www.i-s-o-p.net/pages/about/history.aspx
43. Bloch J, Longerbeam JK, Manax WG, Lillehei RC. Preservative solutions for freezing whole organs in vitro. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1963; 9:139-147.
44. Calne RY, Pegg DE, Pryse-Davies J, Brown FL. Renal preservation by ice-cooling: An experimental study relating to kidney transplantation from cadavers. *Brit Med J* 1963; (ii): 651-654.
45. Lillehei RC, Manax WG, Bloch JH, Eyal Z, Hidalgo F, Longerbeam JK. In vitro preservation of whole organs by hypothermia and hyperbaric oxygenation. *Cryobiology* 1964; 1:181-193.
46. Belzer FO, Southard JH. Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 1988; 45: 673-676.
47. Brettschneider L, Bell PR, Martin AJ Jr, Tarr JS, Taylor PD, Starzl TE. Conservation of the liver. *Transplant Proc* 1969; 1: 132-135.
48. De Boer J, De Meester J, Smits JM, Groenewoud AF, Bok A, Van der Velde O. Eurotransplant randomized multicenter kidney graft preservation study comparing HTK with UW and Euro-Collins. *Transpl Int* 1999; 12: 447.

49. Erhard J, Lange R, Scherer R, Kok WJ. Comparison of histidine tryptophan-ketoglutarate (HTK) solution versus University of Wisconsin (UW) solution for organ preservation in human liver transplantation: A prospective, randomized study. *Transpl Int* 1994; 7: 177-181.
50. Fridell JA, Agarwal A, Milgrom ML, Goggins WC, Murdock P, Peskovitz MD. Comparison of histidine-tryptophan- ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution for organ preservation in clinical pancreas transplantation. *Transplantation* 2004; 77: 1304-1306.
51. Schweizer E, Gassel AM, Deltz E, Schroeder P. A comparison of preservation solutions for small bowel transplantation in the rat. *Transplantation* 1994; 57:1406-1408.
52. Leuvenink HGD, Van Dijk A, Freund RL, Ploeg RJ, Van Goor H. Luminal preservation of rat small intestine with University of Wisconsin or Celsior solution. *Transplant Proc* 2005; 37:445-447.
53. Baláz P, Matia I, Jackanin S, Rybárová E, Kron I, Pomfy M, Fronek J, Ryska M. Preservation injury of the small bowel graft in clinical small bowel transplantation. *Eur Surg Res.* 2004, Jul-Aug; 36(4):192-197.
54. DeRoover AL, Leval J, Gilmaire O, Detry J, Boniver HP, Meurisse M. A new model for human intestinal preservation: Comparison of University of Wisconsin and Celsior preservation solutions. *Transplantation Proceedings* 2004; (36): 270-272.
55. Minor T, Vollmar B, Menger MD, Isselhard W. Cold preservation of the small intestine with the new celsior-solution: First experimental results. *Transplant Int* 1998; 11:32-35.

56. Öner S, Ercan F, Arbak S. Time-dependent morphological alterations of cold-stored small bowel in Euro-Collins and Ringer's lactate solutions. *Acta Histochem* 2004; 106:207-217.
57. Kokudo Y, Furuya T, Takeyoshi I, Nakamura K, Zhang S, Murase N, Todo S. Comparison of University of Wisconsin, Euro-Collins and Ringer's lactate solutions in rat small bowel preservation for orthotopic small bowel transplantation. *Transplant Proc* 1994; 26 (3):1492-1493.
58. Mangus RS, Tector AJ, Fridell JA, Kazimi M, Hollinger E, Vianna RM. Comparison of HTK and Belzer Solution in intestinal and multivisceral transplantation. *Transplantation* 2008, Jul 27th; 86(2):298-302.
59. Raju S, Fujiwara H, Lewin JR, Grocan JB. Twelve hour and twenty four preservation of small bowel allograft by simple hypothermia. *Transplantation* 1988; 45:290-293.
60. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischaemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; (74):1124-1136.
61. Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, Hill ML, Jennings RB. Four brief periods of ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am J Physiol* 1986; 251:1306-1315.
62. Bulkley GB. Preconditioning for protection from ischemia injury: Discriminating cause from the effect from epiphenomenon. *Ann Surg* 2000; 232:163-165.
63. Clavien PA, Yadav S, Sindram D. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg* 2000; 232:155-162.

64. Montero EFS, Quireze C, D'Oliveira DMR. Bile duct exclusion from selective vascular inflow occlusion in rat liver: role of ischemic preconditioning and N-acetylcysteine on hepatic reoperation injury. *Transplantation proceedings* 2005; 37 (1): 425-427.
65. Sola A, De Oca J, Gonzalez R, Prats N, Roselló-Catafau J, Gelpi E, Jaurrieta E, Hotter G. Protective effect of ischemic preconditioning on cold preservation and reperfusion injury associated with rat intestinal transplantation. *Ann Surg* 2001; 234 (1):98-106.
66. Sola A, Hotter G, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Roselló-Catafau J. Modification of oxidative stress in response to intestinal preconditioning. *Transplantation* 2000; 69:767-772.
67. Sileri P, Sica G, Gentileschi P, Venza M, Manzelli A, Palmieri, G, Spagnoli LG, Testa G, Benedetti E, Gaspari AL. Ischemic preconditioning protects intestine from prolonged ischemia. *Transplant Proc.* 2004; 36:283-285.
68. Ferencz A, Sza'nto' Z, Borsiczky B, Kiss K, Kaimar-Nagy K, Szabarenyi J. The effects of preconditioning on the oxidative stress in small-bowel autotransplantation. *Surgery* 2002; 132(5):877-884.
69. De Oca J, Hotter G, Sola A, Gonzalez R, Rafecas A, Roselló-Catafau J, Jaurrieta E. Role of nitric oxide in preconditioning for intestinal transplantation. *Transplant Proc* 1999; 31(6):2573.
70. Hotter G, Closa D, Prados M, Fernandez-Cruz L, Prats N, Gelpi E, Roselló-Catafau J. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 222:27-32.

71. Sola A, Roselló-Catafau J, Alfaro V, Pesquero J, Palacius L, Gelpi E, Hotter G. Modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in response to nitric oxide in intestinal preconditioning. *Transplantation* 1999; 67:1446 -1452.
72. Ferencz A, Szántó Z, Kalmár-Nagy K, Horváth Ö.P., E. Roth. Mitigation of oxidative injury by classic and delayed ischemic preconditioning prior to small bowel autotransplantation. *Transplantation Proceedings* 2004; 36: 286-288.
73. Cosido Hernández L, García García J, García-Criado FJ, Ludeña Cruz MD, Benito Persona MA, Gómez Alonso A. Consecuencias del preconditionamiento sobre los efectos de la isquemia intestinal en un modelo experimental en ratas. *Cir Esp* 2002; 71(2):58-62.
74. Aban N, Cinel L, Tamer L, Aktas A, Aban M. Ischemic preconditioning reduces caspase-related intestinal apoptosis. *Surg Today* 2005; 35:228-234.
75. Aksoyek S, Cinel I, Avlan D, Cinel L, Ozturk C, Gurbuz P. Intestinal ischemic preconditioning protects the intestine and reduces bacterial translocation. *Shock* 2002; 18:476-80.
76. Wang SF, Li GW. Early protective effect of ischemic preconditioning on small intestinal graft in rats. *World J Gastroenterol* 2003, Aug; 9(8):1866-1870.
77. Abrahão MS, Montero EFS, Junqueira VBC, Giavarotti L, Juliano Y, Fagundes DJ. Biochemical and morphological evaluation of ischemia-reperfusion injury in rat small bowel modulated by ischemic preconditioning. *Transplantation Proceedings* 2004; 36: 860-862.

78. Oner S, Ercan F, Fujisaki SAS, Tomita R, Park YJ, Kimizuka, K, Inoue SM, Fukuzawa M. Time-dependent morphological alterations of cold-stored small bowel in Euro-Collins and Ringer's lactate solutions: Semiquantative analysis of expression of mucosal address in cell adhesion molecule-1 during small bowel graft rejection in rats. *Transplantation Proceedings* 2004; 36: 348-349.
79. Galvão FHF, Waitzberg DL, Logulo AF, Sementilli A, Rompenso SC, Lima-Gonçalves E. Histopathological changes in the small intestine after hypothermic preservation with University of Wisconsin solution and Euro-Collins solution. *Rev Assoc Med Bras* 1995; 41:187-192.
80. Cicalese L, Caraceni P, Nalesnik MA, Borle AB, Schraut WH. Oxygen free radical content and neutrophil infiltration are important determinants in mucosal injury after rat small bowel transplantation. *Transplantation* 1996; 62:161-164
81. Uff CR, Reid SD, Wood RF, Pockley AG. *Transplantation*. CD44 expression in rejecting rat small bowel allografts. 1995, 15;60(9):985-989.
82. Sattar A, Robson SC, Patel HRH, Angus B, Campbell FC. Expression of growth regulatory genes in a SCID mouse-human model of intestinal epithelial regeneration. *Journal of Pathology* 1999, Jan; 187(2):229-236.
83. Park PO, Haglund U, Bulkley GB, Falt K. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery* 1990; 107:574-580.
84. Uchiyama M, Mihara M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Biochem* 1978; 86(1):271-278.
85. Salehi P, Zhu JZ, Jay ZJ, Castilho EG, Avila J, Lakey J, Churchill TA. Preserving the mucosal barrier during small bowel storage. *Transplantation* 2003; 76(6):911-917.

86. Muller AR, Nalesnik M, Platz KP, Langrehr JM, Hoffman RA, Schraut WH. Evaluation of preservation conditions and various solutions for small bowel preservation. *Transplantation* 1994; 57:649-655.
87. Fujimoto Y, Olson DW, Madsen KL, Zeng J, Jewell LD, Kneteman NM, Bigam DL, Churchill TA. Defining the role of a tailored luminal solution for small bowel preservation. *Am J Transplant* 2002; 2 (3):229-236.
88. Nydegger EU, Carrel T, Laumonier T, Mohacsi P. New concepts in organ preservation. *Transplant Immunology* 2002; 9:215-225.
89. Olofsson R, Oltean M, Olausson M. Intestinal preservation injury: A comparison between different rat strains. *Transplant Proc.* 2006; 38:1789-1791.
90. Oltean M. Intestinal transplantation: Experimental and clinical studies [Doctoral Thesis], Departments of Surgery and Transplantation, Institute of Clinical Sciences at Sahlgrenska Academy, University of Gothenburg, Sweden, 2010.
91. Moen J, Claesson K, Pienaar H, Lindell S, Ploeg RJ, McANulty JF, Vreugdenhil P, Southard JH, Belzer FO. Preservation of dog liver, kidney, and pancreas using the Belzer-UW solution with a high-sodium and low-potassium content. *Transplantation* 1989; 47(6):940-945.
92. Ploeg RJ., Boudjema K, Marsh D, Bruijn JA, Gooszen HG, Southard JH, Belzer FO. The importance of a colloid in canine pancreas preservation. *Transplantation* 1992; 53(4):735-741.
93. Feng L., Zhao N, Yao X, Sun X, Du L , Diao X, Li S, Li Y. Histidine-tryptophan-ketoglutarate solution vs. University of Wisconsin solution for liver transplantation: A systematic review. *Liver Transpl* 2007. 13(8):1125-1136.

94. Stewart ZA, Lonze BE, Warren DS, Dagher NN, Singer AL, Montgomery RA, Segev DL. Histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) is associated with reduced graft survival in pancreas transplantation. *Am J Transplant* 2009; 9(1): 217-221.
95. Stewart ZA, Lonze BE, Warren DS, Dagher NN, Singer AL, Montgomery RA, Segev DL. Histidine-tryptophan-ketoglutarate (HTK) is associated with reduced graft survival of deceased donor kidney transplants. *Am J Transplant* 2009; 9(5):1048-1054.
96. Stewart ZA, Cameron AM, Singer AL, Montgomery RA, Segev DL. Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate (HTK) is associated with reduced graft survival in deceased donor livers, especially those donated after cardiac death. *Am J Transplant* 2009; 9(2):286-293.
97. Audet M, Alexandre E, Mustun A, David P, Chenard-Neu MP, Tiollier J, Jaeck D, Cinqualbre J, Wolf P, Boudjema K. Comparative evaluation of Celsior solution versus Viaspan in a pig liver transplantation model. *Transplantation* 2001; 71(12):1731-1735.
98. Karam G, Compagnon P, Hourmant M, Despins P, Duveau D, Noury D, Boudjema, K. A single solution for multiple organ procurement and preservation. *Transpl Int* 2005; 18(6):657-663.
99. Taguchi T, Suita S. Segmental small-intestinal transplantation: A comparison of jejunal and ileal grafts. *Surgery* 2002; (131): 294-300
100. Thompson JS, Ferguson DC, Quigley EMM. Comparison of ileal and jejunal transplantation after 50% small intestinal resection. *J Surg Res* 1999; 81(1):91-94.
101. Jácome DT, Abrahão MS, Morello RJ, Martins JL, Medeiros AC, Montero EFS. Different intervals of ischemic preconditioning on small bowel ischemia-reperfusion injury in rats. *Transplantation Proceedings* 2009; (41): 827-829.

102. Quaedackers JSLT, Beuk RJ, Bennet L, Charlton A, Egbrink MGA, Gunn AJ, Heineman F. An evaluation of methods for grading histologic injury following ischemia-reperfusion of the small bowel. *Transplant Proc* 2000; 32:1307-1310.
103. Bertoletto PR. Estudo morfológico do intestino delgado de ratos na isquemia-reperfusão sob oxigenação hiperbárica [Tese Mestrado]. Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação, São Paulo 2005.
104. Chiu C, McArdle AH, Brown R, Scott HJ, Gurd FN. Intestinal mucosal lesion in low-flow states. *Arch Surg* 1970; 101:478-483.
105. Gravieli Y, Sherman Y, Bem-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 1992; 119:493-501.
106. Shah KA, Shurey S, Green CJ. Apoptosis after intestinal ischemia reperfusion injury: A morphological study. *Transplantation* 1997; 64:1393-1397.
107. Ikeda H, Suzuki Y, Suzuki M, Koike M, Tamura J, Tong J, Nomura M, Itoh G. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischaemia-reperfusion injury to the rat intestinal epithelium. *Gut* 1998; 42:530-537.
108. Azuara D, Sola A, Hotter G, Calatayud L, Oca J. Apoptosis inhibition plays a greater role than necrosis inhibition in decreasing bacterial translocation in experimental intestinal transplantation. *Surgery* 2005; 137:85-91.
109. Genescá M, Sola A, Azuara D, De Oca J, Hotter G. Apoptosis inhibition during preservation by fructose-1,6-diphosphate and theophylline in rat intestinal transplantation. *Crit Care Med* 2005; 33:827-834.

110. Bacchi CE, Gown AM. Detection of cell proliferation in tissue sections. *Brazilian J Med Biol Res* 1993; 26:677-87.
111. Takeyoshi I, Zhang S, Nomoto M, Zhu Y, Kokudo Y, Suzuki T. Mucosal damage and recovery of the intestine after prolonged preservation and transplantation in dogs. *Transplantation* 2001; 71:1-7.
112. Salehi P, Churchill TA. The influence of short-term fasting on the quality of small bowel graft preservation. *Cryobiology* 2005; 50:83-92.
113. Aguilar-Nascimento JE. Evaluation of Intestinal Trophism. *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 2006; 9:257-262.
114. Oltean M, Pullerits R, Zhu C, Blomgren K, Hallberg EC, Olausson M. Donor pretreatment with FK506 reduces reperfusion injury and accelerates intestinal graft recovery in rats. *Surgery* 2007; 141(5):667-677.
115. Muskhelishvili L, Latendresse JR, Kodell RL, Henderson EB. Evaluation of cell proliferation in rat tissues with BrdU, PCNA, Ki-67(MIB-5) immunohistochemistry and in situ hybridization for histone mRNA. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 2003, Vol. 51(12): 1681-1688.
116. Ferencz A, Nedvig K, Fekecs T, Rácz B, Weber G, Hashimoto H, Baba A, Helyes Z, Reglödi D. Comparison of intestinal cold preservation injury on pituitary adenylate cyclase-Activating polypeptide in knockout and wild-type mice. *Transplantation Proceedings* 2010; 42: 2293-2295.
117. Cine I, Avlan D, Cinel L, Polat G, Atici S, Mavioglu I, Serinol H, Aksoyek S, Oral U. Ischemic preconditioning reduces intestinal epithelial apoptosis in rats. *Shock* 2003, Jun; 19(6):588-592.
118. Guimarães, FAG. Estudo morfológico do intestino delgado de ratos submetido à oxigenação hiperbárica hipotérmica [Tese de Doutorado], Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Experimentação, São Paulo, 2007.

119. Straatsburg IH, Abrahamse SL, Song SW, Hartman RJ, Van Gulik TM. Evaluation of rat liver apoptotic and necrotic cell death after Cold Storage Using UW, HTK, and Celsior. *Transplantation* 2002; 74: 458-464.
120. Ueno T & Fukuzawa M. Current status of intestinal transplantation. *Surg Today* 2010; 40:1112-1122.

9. BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

1. Rother ET & Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2ª edição São Paulo, 2005.
2. Dicionário Aurélio eletrônico 2000[CD-ROM]. São Paulo: Nova Fronteira; 2000. Sumário
3. Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa/Academia Brasileira de Letras. 5ª Edição, São Paulo: Global, 2009.

ABSTRACT

Effects of ischemic preconditioning associated with different preservation solutions, in the small bowel preserved under hypothermia

BACKGROUND: The preservation of intestinal grafts is a determining factor for the success of small intestine transplantation. **OBJECTIVE:** To evaluate the effects of ischemic preconditioning associated with Belzer, Celsior, Custodiol and Ringer-Lactate solution in the intestinal preservation and which of these solutions, alone, has better performance. **METHODS:** We formed randomly, four groups of 14 male Wistar rats weighing between 250 and 300 grams, all of them underwent laparotomy and collection 20cm of ileum for preservation under hypothermia, in Ringer solution (RL), Celsior (Cs), Custodiol (Cust) and Belzer (Belz), for a period of 24 hours. Prior to collection of the ileal segment, half the animals in each group was subjected to ischemic preconditioning of the small intestine (IPC), which consisted of occlusion of superior mesenteric artery for 10 minutes followed by release of the flow (reperfusion) for the same period. During the period of preservation, intestinal samples were collected for four times: with Zero, 12, 18 and 24 hours. In each of these moments were performed: analysis of the degree of mucosal injury (score of Park et al.); dosage of tecdial acid malondialdehyde (MDA) in nmol/mg; quantification of apoptosis in intestinal villi by immunohistochemistry with anti-caspase3. The statistical tests used were ANOVA, Tukey, Kruskal-Wallis and Mann-Whitney; p-values<0.05 were considered significant. **RESULTS:** In animals without ipc, MDA values, degree of mucosal injury and apoptosis were higher in RL group, and apoptosis was significantly lower in Cs and Belz ($p<0.05$). In groups with the ipc, RL showed higher MDA values at 18 and 24 hours of preservation ($p<0.05$). The grades of mucosal injury and apoptosis, except for zero hour, were higher in RL and Cust and lower in the Cs and Belz group, **CONCLUSIONS:** Celsior and Belzer solutions had better protective effects on intestinal graft, and these effects were augmented by ischemic preconditioning.

São Paulo, 19 de novembro de 2008.
CEP 1278/08

Ilmo(a). Sr(a).
Pesquisador(a) JOSE DE SOUZA NEVES
Co-Investigadores: Edna Frasson de Souza Montero, Adriano Miziara Gonzales (orientador)
Disciplina/Departamento: Gastroenterologia Cirúrgica/Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo
Patrocinador: Recursos Próprios.

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA INSTITUCIONAL

Ref: Projeto de pesquisa intitulado: **“Efeitos do pré-condicionamento isquêmico associado às soluções University of Wisconsin, histidine-tryptophane-ketoglutarate, e celsior na preservação hipotérmica do intestino delgado”**.

CARACTERÍSTICA PRINCIPAL DO ESTUDO: Experimental, categoria C - estudo agudo.

RISCOS ADICIONAIS PARA O PACIENTE: Não se aplica.

OBJETIVOS: Avaliar os efeitos do pré-condicionamento isquêmico na proteção do enxerto intestinal na fase de preservação isquêmica hipotérmica. Avaliar qual das soluções de preservação tem maior eficácia na proteção do enxerto de intestino delgado. Avaliar se a associação do pré-condicionamento isquêmico com as soluções de preservação UK, UHT e CS tem efeito benéfico na preservação do intestino delgado..

RESUMO: Estudo com Ratos Wistar. Anestésico: xilasina/quetamina. Eutanásia: overdose de anestésico. Serão constituídos 3 grupos de 20 animais cada: grupo UK (sol de Belzer). grupoCS (sol de Celsior) e grupo HTK (sol de histidina-tryptofano-cetoglutarato). Serão constituídos subgrupos de cada um destes grupos, com metade dos animais. Em um subgrupo serão coletados 40 cm de intestino, será realizada infusão intraluminal da solução específica de cada grupo e o segmento intestinal será preservado por um período de 24 horas, a uma temperatura de 4 graus. No outro subgrupo, será realizado o mesmo procedimento, porém, antes da coleta, será realizado o pré-condicionamento isquêmico. O pré-condicionamento isquêmico será realizado pela oclusão da artéria mesentérica superior por 5 minutos, seguido de liberação do fluxo e reperfusão pelo mesmo período. Esse procedimento será repetido por 3 vezes consecutivas. Após 12, 18 e 24 horas de preservação do enxerto nas soluções correspondentes, uma parte do segmento intestinal será homogeneizada para dosagens bioquímicas e outro segmento será utilizado para o preparo de lâminas, estudos histológicos e imunohistoquímicos. Serão estudadas variáveis bioquímicas, histológicas análise de microscopia eletrônica das vilosidades e microvilosidades intestinais e feita avaliação da apoptose..

FUNDAMENTOS E RACIONAL: O pré-condicionamento isquêmico , bem como o uso de soluções de preservação, pode contribuir para a diminuição da injúria da mucosa entérica, diminuindo complicações pós-transplante. Porém, não há consenso quanto à escolha da solução ideal, existindo poucos estudos avaliando os efeitos do pré-condicionamento na fase de isquemia..

MATERIAL E MÉTODO: Estão descritos os procedimentos a serem realizados. Foram respondidas as pendências emitidas pelos relatores..

DETALHAMENTO FINANCEIRO: Sem financiamento externo.

CRONOGRAMA: 4 meses.

OBJETIVO ACADÊMICO: Doutorado.

ENTREGA DE RELATÓRIOS PARCIAIS AO CEP PREVISTOS PARA: **14/11/2009** e **14/11/2010**.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo/Hospital São Paulo **ANALISOU** e **APROVOU** o projeto de pesquisa referenciado.

1. Comunicar toda e qualquer alteração do projeto.
2. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
3. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Osmar Medina Pestana

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Universidade Federal de São Paulo/ Hospital São Paulo

RECOMENDAÇÃO: De posse do resultado do estudo estatístico para detemrinar o N, sugere-se utilizar o menor número possível de animais.