

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**PERFIL DE ATIVAÇÃO DAS MAP QUINASES ERK 1/2 NO  
INTESTINO DELGADO DE EQÜINOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E  
REPERFUSÃO**

Luciana Ramos Gaston Brandstetter  
Orientador: Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo

GOIÂNIA  
2006

LUCIANA RAMOS GASTON BRANDSTETTER

**PERFIL DE ATIVAÇÃO DAS MAP QUINASES ERK 1/2 NO  
INTESTINO DELGADO DE EQÜINOS SUBMETIDOS À ISQUEMIA E  
REPERFUSÃO**

Dissertação apresentada para  
obtenção do grau de Mestre em  
Ciência Animal junto à Escola  
de Veterinária da Universidade  
Federal de Goiás

**Área de Concentração:**  
Patologia, clínica e cirurgia animal.

**Orientador:**

Prof. Dr. Eugênio Gonçalves de Araújo - EV/UFG

**Comitê de Orientação:**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Clorinda S. Fioravanti - EV/UFG

Prof. Dr. Luiz Augusto Batista Brito - EV/UFG

GOIÂNIA  
2006

Dedico este trabalho aos meus pais  
Walter e Célia

## AGRADECIMENTOS

A Deus por me guiar pelos caminhos que levam ao conhecimento;  
Aos meus pais e irmãos pela confiança, generosidade e amor infinitos;  
Ao meu noivo Bruno Batista pelo enorme apoio, confiança e amor;  
À Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, por viabilizar a realização deste trabalho;

Ao meu orientador Eugênio Gonçalves de Araújo, por ter acreditado na minha capacidade desde o início da graduação;

Aos meus co-orientadores Maria Clorinda Soares Fioravanti e Luiz Augusto Batista Brito pelo sorriso no rosto e disposição para esclarecer dúvidas e ajudar sempre que necessário;

Aos amigos e colegas Adilson Donizeti Damasceno, Bruno Rodrigues Trindade, Kellen de Sousa Oliveira e Marina Pacheco Miguel pela ajuda e disponibilidade;

À minha amiga Liliana Borges de Menezes pela enorme boa vontade e disponibilidade em todos os momentos;

À amiga e colega Raquel Soares Juliano pela grande ajuda e paciência;

Às empresas: Agener União Saúde Animal, Halexlstar Indústria Farmacêutica Ltda, Produtos Veterinários Ouro Fino Ltda e Vetbrands Saúde Animal; e ao colega Carlos Augusto Salvagni pela contribuição com medicamentos para viabilizar o experimento;

À Sociedade Objetivo de Ensino Superior por ceder o centro cirúrgico e laboratório para a realização da fase experimental;

À equipe do Hospital Veterinário da Sociedade Objetivo de Ensino Superior, pelo empenho na realização das cirurgias;

Ao aluno de medicina veterinária pela Sociedade Objetivo de Ensino Superior, Julio César Souza Faria pela ajuda na realização da imunoistoquímica;

Aos colegas Apóstolo Ferreira Martins e Carlos Eduardo Chiquetto por contribuírem substancialmente na realização dos protocolos anestésicos;

Aos médicos veterinários Nathaniel A. White, II e Anthony Blikslager pelo envio de material bibliográfico;

Ao funcionário do Setor de Patologia da Escola de Veterinária-UFG  
Antônio Souza pelo processamento das lâminas e boa vontade constante;  
Aos animais que perderam a vida para a realização deste experimento.

“A sabedoria própria dos sábios  
consiste em uma extraordinária  
dose de bom senso”.

Reitor W.R. Inge

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Morfologia e função do intestino delgado.....	3
2.2 Mecanismos fisiopatológicos dos processos envolvendo o intestino delgado.....	4
2.3 Apoptose no intestino .....	12
2.4 MAP Quinases.....	12
2.5 ERK e apoptose.....	15
3 OBJETIVOS .....	18
3.1 Objetivo geral.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	18
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Local de realização.....	19
4.2 Animais em experimentação.....	19
4.3 Procedimento cirúrgico.....	20
4.4 Amostras.....	22
4.5 Processamento das amostras.....	23
4.5.1 Imunoistoquímica.....	23
4.6 Análise estatística.....	25
5 RESULTADOS.....	26
5.1 Alterações macroscópicas .....	26
5.2 Estudo microscópico.....	27
5.3 Estudo imunoistoquímico com anticorpo policlonal phospho p44/42 (ERK1/2).....	30
6 DISCUSSÃO.....	36
7 CONCLUSÕES.....	42
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXOS.....	52

**LISTA DE FIGURAS**

- Figura 1 Representação esquemática da conversão da hipoxantina em xantina e ácido úrico, (A) conversão realizada pela enzima xantina desidrogenase em condições normais e (B) quando há reperfusão ocorre conversão realizada pela enzima xantina oxidase com formação de um radical superóxido e a reação é catalisada pelo oxigênio.....11
- Figura 2 Representação esquemática da via de transdução de sinal da MAP quinase ERK 1/2. Quando um agonista (como o TNF- $\alpha$ , por exemplo) liga-se ao receptor tirosina quinase, ocorre uma auto-fosforilação e coaptação de um complexo de proteínas (Shc/Grb2/Sos) que ativa Ras próximo à membrana. Ras ativa c-Raf-1, ou MAP quinase quinase quinase, que por sua vez fosforila a próxima quinase do módulo, MEK 1/2 (MAP quinase quinase). MEK 1/2 forma um complexo citoplasmático com ERK 1/2 (MAP quinase) inativada; quando MEK fosforila ERK, as duas se separam, e ERK ativada transloca-se rapidamente para o núcleo, onde fosforila substratos tais como o fator de transcrição FT, incrementando a transcrição de genes envolvidos em processos como contração de musculatura estriada e lisa, inflamação e edema, controle do tônus vascular, sobrevivência e função do miocárdio. A fosfatase MKP-1 defosforila e desativa ERK 1/2, que novamente forma um complexo com MEK 1/2.....17
- Figura 3 Segmento isolado de jejuno de eqüinos mostrando o revestimento de látex em pinças de Kocher (seta larga) e tubos de látex posicionados nas extremidades do segmento para bloquear a circulação mural (seta).....22
- Figura 4 Segmentos isolados de jejuno de eqüinos, (A) animal “D” aos 40 minutos de isquemia mostrando áreas de palidez na serosa (seta) e (B) animal “G” aos 41 minutos de reperfusão mostrando áreas difusas de palidez na serosa (seta larga).....27
- Figura 5 Segmento isolado de jejuno do animal “D” aos 40 minutos de isquemia mostrando (A) veias jejunais apresentando estase e coloração escura

(seta), (B) veias jejunais apresentando estase na área isquêmica (seta) e veias não ocluídas adjacentes (seta larga).....	27
Figura 6 Segmentos isolados de jejuno de eqüinos corados por HE: (A) camada muscular circular (seta) do animal “C” apresentando perda da conexão entre as células e degeneração celular após duas horas de reperfusão (400x); (B) a mesma camada muscular no animal “B” após uma hora de reperfusão contendo células degenerativas com citoplasma condensado (seta larga) (400x); (C) animal “F” na amostra 5, apresentando edema intenso na região da base das criptas (seta dupla) (400x) e (D) o mesmo animal apresentando edema intenso na lâmina própria (seta curta) (400x).....	29
Figura 7 Segmentos isolados de jejuno de eqüinos corados por HE: (A) edema intenso na submucosa (seta) do animal “C” após duas horas de reperfusão (40x); (B) submucosa do animal “A” após cinco minutos de isquemia apresentando macrófagos contendo hemossiderina (seta larga) (400x).....	30
Figura 8 Intensidade média de ativação das células da camada muscular da mucosa do jejuno de eqüinos marcadas pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos diferentes momentos de colheita.....	31
Figura 9 Fotomicrografia de fragmentos de jejuno de eqüinos (A) corte positivo do animal “E” no momento dois, mostrando o plexo mioentérico (seta) marcado pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 (40x) (B) corte negativo do animal “G” na amostra 1, mostrando a ausência de marcação no plexo mioentérico (seta) e a marcação inespecífica do epitélio (seta larga) (40x).....	31
Figura 10 Intensidade média de ativação das células da camada muscular circular do jejuno de eqüinos marcadas pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos diferentes momentos de colheita.....	32
Figura 11 Fotomicrografia de camadas musculares de jejuno de eqüinos marcadas pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 aos cinco minutos de reperfusão (A) e (B) animal “D” no pico de ativação de p44/42, camada muscular interna (seta larga), plexo mioentérico (seta curta), camada muscular externa apresentando escore três de ativação	

(seta dupla) (40x e 100x); (C) e (D) animal “C” na amostra 3 apresentando os mesmos níveis de marcação que o animal “D” (40x e 400x) .....	33
Figura 12 Intensidade média de ativação das células da camada muscular longitudinal do jejuno de eqüinos marcadas pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos diferentes momentos de colheita.....	34
Figura 13 Intensidade média de ativação das células do plexo mioentérico do jejuno de eqüinos marcadas pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos diferentes momentos de colheita.....	34
Figura 14 Fotomicrografia de fragmentos de jejuno de eqüinos mostrando o endotélio vascular marcado pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 (seta) (A) animal “C” aos cinco minutos de isquemia (400x) e (B) animal “E” após duas horas de reperfusão (400x).....	35

**LISTA DE QUADROS**

Quadro 1 Critérios de avaliação para os testes de imunoistoquímica .....	25
Quadro 2 Marcação pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos cortes positivos das células de diferentes camadas do jejun no animal “A”, em cinco momentos de coleta diferentes.....	52
Quadro 3 Marcação pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos cortes positivos das células de diferentes camadas do jejun no animal “B”, em cinco momentos de coleta diferentes.....	53
Quadro 4 Marcação pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos cortes positivos das células de diferentes camadas do jejun no animal “C”, em cinco momentos de coleta diferentes.....	54
Quadro 5 Marcação pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos cortes positivos das células de diferentes camadas do jejun no animal “D”, em cinco momentos de coleta diferentes.....	55
Quadro 6 Marcação pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos cortes positivos das células de diferentes camadas do jejun no animal “E”, em cinco momentos de coleta diferentes.....	56
Quadro 7 Marcação pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos cortes positivos das células de diferentes camadas do jejun no animal “F”, em cinco momentos de coleta diferentes.....	57
Quadro 8 Marcação pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos cortes positivos das células de diferentes camadas do jejun no animal “G”, em cinco momentos de coleta diferentes.....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	adenosina tri-fosfato
Bcl-2	enzima anti-apoptótica
Bcl-X <sub>L</sub>	enzima anti-apoptótica
BSA	albumina bovina sérica
ecNOS	isoforma constitutiva da óxido nítrico sintetase
ERK	quinase regulada pela sinalização extracelular
FT	fator de transcrição
GDP	guanosina difosfato
Grb	proteína de adaptação
GTP	guanosina trifosfato
HE	hematoxilina e eosina
IL-1 $\beta$	interleucina 1 $\beta$
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
IL-10	interleucina 10
iNOS	isoforma induzível da óxido nítrico sintetase
I/R	isquemia seguida de reperfusão
JNK	quinase regulada pela sinalização extracelular
K <sup>+</sup>	íon potássio
LPS	lipopolissacarídeo
MAP	proteína ativada por mitógeno
MAPKKK	MAP quinase quinase quinase
MAPKK	MAP quinase quinase
MAPK	MAP quinase
MEK 1/2	isoforma de MAPKK
MKP-1	fosfatase que desativa ERK 1/2 (CL-100)
MKP-3	fosfatase que desativa ERK 1/2 (Pyst 1)
Na <sup>+</sup>	íon sódio
NADPH	dinucleotídeo adenina nicotinamida fosfato
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintetase

OH <sup>-</sup>	radical hidroxil
PAF	fator de agregação plaquetária
PBS	phosphate buffered saline (tampão fosfato)
PD98059	inibidor de ERK 1/2
PDGF	fator de crescimento derivado das plaquetas
PMNs	polimorfonucleares
p38	quinase regulada pela sinalização extracelular
p44/42	ERK1/2
Pro	prolina
PTB	domínio de ligação de fosfotirosina
Raf	proteína capaz de fosforilar MEKs
Raf-1	isoforma de Raf
Ras	proteína da superfamília das proteínas G
Rho	proteína da superfamília das proteínas G
RTK	receptor tirosina quinase
Ser	serina
Shc	proteína de adaptação
SH2	domínio de homologia 2 Src
Sos	<i>son of sevenless</i> (proteína de adaptação)
Src	proteína tirosina quinase
Thr	treonina
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral alfa
Tween 20	polioxietilenosorbitol monolaurato (densidade 20)
TXA <sub>2</sub>	tromboxano A 2
Tyr	tirosina

## RESUMO

Os maiores índices de fatalidade entre os eqüinos acometidos por cólica estão relacionados às doenças envolvendo o estrangulamento isquêmico de segmentos do intestino delgado. Entretanto, mesmo quando a perfusão sangüínea é restabelecida, o processo degenerativo continua, resultando na chamada injúria de reperfusão. Experimentos prévios mostraram que as MAP quinases são ativadas em resposta a vários estímulos extracelulares e geralmente estão associadas a um aumento ou inibição da atividade de apoptose. Este experimento teve como objetivo delinear o perfil de ativação das MAP quinases ERK 1/2 no jejuno de eqüinos experimentalmente submetidos a uma isquemia artério-venosa completa com duração de 60 minutos, seguida de reperfusão com duração de 120 minutos; por meio de testes de imunoistoquímica, com emprego de anticorpos que reconhecem especificamente as formas fosforiladas das quinases. Os resultados desta pesquisa mostram a existência de níveis expressivos da forma ativada de ERK 1/2 no plexo mioentérico e camada muscular longitudinal. Esses achados associados à presença de lesões microscópicas bastante discretas constatadas nestes grupos celulares, se comparadas às lesões encontradas nas camadas mucosa, submucosa e muscular circular, sugerem que a ação protetora atribuída a ERK, pode ter participação importante na redução dos efeitos deletérios provocados pela isquemia e reperfusão do intestino delgado de eqüinos.

Palavras-chave: eqüino, ERK, imunoistoquímica, intestino, MAP quinase, reperfusão.

## ABSTRACT

The majority of fatal colic cases among horses are related to diseases involving small intestine ischemic strangulating obstruction. However, even when blood flow is reestablished, the degenerative process continues resulting in reperfusion injury. Previous studies have shown that MAP kinases are activated by several extra cellular stimuli and are usually associated with either an increase or inhibition of apoptosis. The involvement of inflammation mediators in intestinal ischemia/reperfusion could be related to ERK 1/2 anti-apoptotic activity. This study investigated the MAP kinases ERK 1/2 activation profile in equine jejunum subjected to 60 minutes of complete arteriovenous ischemia followed by 120 minutes of reperfusion, by means of immunohistochemistry, using antibodies that recognize the specific phosphorylated kinase forms. Increased levels of activated ERK forms were seen in both myoenteric plexus and longitudinal muscle layer. In addition, the microscopic lesions found in these cell groups were mild compared to lesions observed in the mucosa, submucosa and circular muscle. These results suggest that ERK protection may downsize deleterious effects caused by equine small intestinal isquemia/reperfusion.

Keywords: equine, ERK, immunohistochemistry, intestine, MAP kinase, reperfusion.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil possui o terceiro maior rebanho eqüino do mundo, com 5,9 milhões de cabeças, segundo números da FAO (*Food and Agriculture Organization*) de 2002, perdendo apenas para o México e China. Só no Estado de Goiás, o rebanho compreende aproximadamente 450 mil cabeças. Com esses números, a criação e comercialização de cavalos transformaram-se num negócio para muitos, ocupando diretamente mais de 500 mil pessoas no país. O desbravamento de novas áreas produtivas, além do uso como meio de transporte, serviços e lazer, dão importante dimensão econômica à criação desses animais no Brasil (GUERRA, 2003).

A síndrome cólica é uma preocupação constante no âmbito da criação de eqüinos do mundo inteiro. Um estudo realizado nos Estados Unidos mostrou que aproximadamente 4% dos cavalos apresentam um episódio de cólica anualmente com índice de fatalidade de 11% (TRAUB-DARGATZ et al., 2001).

Entre os inúmeros mecanismos fisiopatológicos da cólica eqüina, a obstrução do intestino delgado por estrangulamento constitui uma das principais causas de óbito. Trata-se de um processo que cursa simultaneamente com a oclusão do lúmen intestinal e da vasculatura, resultando em lesão isquêmica da mucosa (GERARD et al., 1999; WHITE et al., 1980). A lesão isquêmica também pode ocorrer como resultado de outros processos patológicos, como os casos de obstrução simples, onde a progressão da distensão no aspecto proximal à obstrução, leva a um aumento da pressão intraluminal e consequente oclusão da circulação na parede intestinal (ALLEN et al., 1988). Além disso, casos de infarto não estrangulante podem ocorrer, os quais normalmente estão relacionados à migração de parasitas pelos vasos (WHITE, 1981).

A correção cirúrgica do intestino delgado estrangulado é seguida de lesão celular adicional, que vai ocorrer quando há reperfusão do tecido isquêmico (DABAREINER et al., 1993). Se as células foram previamente lesadas pela isquemia, a lesão de reperfusão pode resultar em inflamação, apoptose e necrose, o que por sua vez, vai prolongar o processo de cicatrização. As lesões de reperfusão são mais comumente observadas seguidas de isquemia de baixo fluxo sanguíneo, mas também podem ser precedidas de isquemia total, com

exceção dos casos onde tenha ocorrido lesão celular tão severa que não permita que as células respondam à reperfusão (PARKS et al., 1982).

O conceito de injúria de reperfusão se baseia em achados experimentais nos quais a lesão de mucosa se intensifica após a reperfusão da área isquêmica. Este conceito parece contraditório, já que a injúria isquêmica da mucosa é resultante da ausência de fluxo de sangue oxigenado (ZIMMERMAN & GRANGER, 1990). Entre as alterações que ocorrem durante a reperfusão do intestino após isquemia experimental estão: aumento da permeabilidade microvascular, desprendimento das células da mucosa, aumento de volume das células endoteliais, infiltração de neutrófilos, perda da camada mesotelial da serosa e dilatação linfática (MOORE et al., 1994).

Existem grandes evidências de que as MAP (*Mitogen Activated Protein*) quinases são ativadas durante a isquemia e/ou reperfusão e podem contribuir com mudanças estruturais e funcionais do órgão afetado (ABE et al., 2000). Há indicações de que a ativação das MAP quinases (MAPK) ERKs participa da inibição da apoptose (SHAN et al., 1999).

Essa dissertação traz novas informações a respeito das atividades de ERK 1/2 no intestino delgado de eqüinos submetidos a isquemia e reperfusão experimental, o que poderá contribuir para a elucidação do mecanismo celular das doenças intestinais isquêmicas em eqüinos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Morfologia e função do intestino delgado

O intestino delgado dos eqüinos, que é semelhante ao de muitas espécies de animais domésticos, está anatomicamente dividido em três grandes segmentos: duodeno, jejunum e íleo. Seu comprimento médio é de aproximadamente 25 m, sendo que o jejunum é o mais longo dos segmentos, o que predispõe o mesmo à formação de hérnia, intussuscepção e vólvulo. O duodeno e o íleo normalmente não ultrapassam um metro de comprimento cada um. A maior parte do intestino delgado recebe suprimento sanguíneo de vários ramos da artéria mesentérica cranial (DORAN et al., 1992).

A divisão histológica em camadas do intestino delgado dos eqüinos também é semelhante à de muitas outras espécies, sendo formada por mucosa, submucosa, muscular circular e longitudinal (interna e externa respectivamente) e serosa. A mucosa é constituída por células epiteliais colunares alinhadas em vilosidades (projeções alongadas) que conferem uma maior superfície de contato à mesma (DORAN et al., 1992). As chamadas criptas de Lieberkühn ou glândulas intestinais são invaginações tubulares localizadas na base das vilosidades. Glândulas intestinais de Brunner estão presentes na submucosa e são do tipo seroso, se estendendo do duodeno ao jejunum. A muscular longitudinal é particularmente espessa e possui um plexo mioentérico evidente no jejunum. A serosa consiste em uma camada mais espessa de tecido conectivo frouxo (PFEIFFER & MACPHERSON, 1990).

A capacidade de absorção do intestino delgado é importante no transporte de líquidos e ingesta do lúmen até o sistema linfático ou vascular, para posterior processamento. O intestino delgado é considerado um órgão bastante ativo metabolicamente, mas sua função mais óbvia talvez seja o trânsito aboral de material ingerido e secretado desde o estômago até o ceco e cólon maior (DORAN et al., 1992).

## 2.2 Mecanismos fisiopatológicos dos processos envolvendo o intestino delgado

Uma oclusão em qualquer ponto do intestino pode resultar em distensão e dor abdominal. A obstrução física do intestino delgado pode ser classificada em não estrangulante e estrangulante (HAY & MUELLER, 1999b).

A obstrução não estrangulante impede a chegada de líquido à superfície absorptiva do intestino grosso (MAIR & EDWARDS, 2003). A patologia é causada por massas intraluminais, ou o lúmen do segmento pode estar reduzido por espessamento intramural ou compressão extramural (HAY & MUELLER, 1999a). O líquido fica então seqüestrado no lúmen do intestino delgado, resultando em hipovolemia, diminuição do débito cardíaco e desequilíbrios ácido-básico e hidro-eletrolítico (MAIR & EDWARDS, 2003). O líquido, gás e ingesta que se acumulam na porção proximal ao local da obstrução são provenientes de inúmeras fontes, incluindo saliva, secreções gástricas, ar engolido, secreções pancreáticas, bile, gás resultante da fermentação bacteriana, líquidos e alimentos ingeridos, além de secreções da própria mucosa intestinal. Com a pressão intraluminal aumentada, ocorre paralelamente uma diminuição das ondas peristálticas, que em alguns casos chegam a cessar, resultando em um segmento tubular, atônico e distendido. Quando a pressão intraluminal ultrapassa 15 cm H<sub>2</sub>O, cessa também a absorção de água pela mucosa e, contrariamente, a mesma passa a secretar água para o lúmen intestinal, dando origem a um fenômeno denominado fluxo reverso. O fluxo reverso é aparentemente resultante de um aumento da pressão de filtração capilar em resposta à pressão intraluminal aumentada, o que agrava ainda mais o quadro. A pressão aumentada combinada à expansão do volume de líquidos provoca refluxo gástrico. O estômago então se distende, podendo comprimir o diafragma e a veia cava, o que torna possível o aparecimento de alterações das funções pulmonares e redução do retorno sanguíneo cardíaco, agravando o quadro de hipovolemia. Outra possível complicação da distensão estomacal é a ruptura do órgão (ALLEN & TYLER, 1990).

A elevação da pressão hidrostática vascular do intestino, em decorrência da pressão intra-luminal também aumentada, pode acarretar o

vazamento de plasma rico em proteínas para a cavidade abdominal. Embora o total de proteínas perdido seja significante, a pressão oncótica intra-vascular normalmente não é afetada nos estágios iniciais do processo; isto se deve à concomitante perda de água para o lúmen intestinal. Alguns leucócitos e eritrócitos aparecem no líquido peritoneal nas fases iniciais (12 a 24 horas), podendo se tornar numerosos com a progressão do quadro degenerativo e comprometimento da parede intestinal (ALLEN & TYLER, 1990).

Na obstrução estrangulante ocorre a mesma dinâmica de líquidos descrita nos casos não estrangulantes, podendo haver desenvolvimento de íleo paralítico, seqüestro luminal de líquidos corporais, hipovolemia e refluxo gástrico. Além disso, ocorre um comprometimento vascular paralelo resultante de oclusões venosas ou artério-venosas (ALLEN & TYLER, 1990). Quando há obstrução do lúmen com oclusão venosa apenas, o processo é definido como estrangulamento hemorrágico. Neste caso, o fluxo arterial continua, levando a um aumento da pressão hidrostática venosa e capilar (TEDDER et al., 1995). Minutos após o estrangulamento, o segmento envolvido e o mesentério correspondente se tornam bastante congestos, enquanto as veias e vênulas se distendem. À medida que ocorre depleção do oxigênio, o segmento passa a ter aparência negra e avermelhada. O endotélio vascular fica mais permeável, permitindo a difusão de plasma para os tecidos. Com o aumento da permeabilidade o transudato logo se transforma em exsudato, já que há extravasamento de fibrinogênio e chegada de células inflamatórias ao local. Após algumas horas a degeneração vascular do endotélio se torna tão extensa que o sangue extravasa para os tecidos e eventualmente para o lúmen do segmento envolvido (ALLEN & TYLER, 1990), daí a definição do fenômeno como estrangulamento hemorrágico. O resultado deste processo é a formação de edema e hemorragia, os quais são facilmente observados macroscopicamente. Num último estágio, a hipóxia e isquemia que se desenvolvem rapidamente podem ocasionar a necrose do segmento envolvido e endotoxemia (TEDDER et al., 1995).

Quando ocorre obstrução do lúmen acompanhada por oclusão arterial e venosa simultâneas, o fenômeno é denominado estrangulamento isquêmico (SNYDER, 1989). Neste caso não é comum o desenvolvimento de hemorragia ou

edema. A serosa se apresenta pálida, acinzentada e mosqueada e a mucosa varia de uma aparência normal até um vermelho escuro (TEDDER et al., 1995).

É importante ressaltar que durante os estágios iniciais de estrangulamento hemorrágico, o grau de lesão de mucosa está reduzido, se comparado com as circunstâncias onde o estrangulamento isquêmico está presente, embora haja alterações bastante visíveis na coloração das alças intestinais no primeiro caso. Contraditoriamente, lesões causadas pelo estrangulamento isquêmico não parecem ser severas e o segmento afetado pode retomar a coloração rósea e ter motilidade durante a reperfusão, apesar de apresentar, muitas vezes, lesões severas de mucosa (BLIKSLAGER, 2003).

As células em geral possuem capacidade de aumentar a extração de oxigênio caso ocorra redução do fluxo sanguíneo; desta forma elas continuam a exercer suas funções com reservas de energia. No entanto, se o fluxo sanguíneo é reduzido a níveis inferiores aos necessários para manter a viabilidade das células, ou se o consumo de oxigênio aumenta, o metabolismo é comprometido e ocorrem mudanças tanto na estrutura como nas funções celulares. Diferentes células do intestino possuem demandas metabólicas e susceptibilidade à isquemia também diferentes. As células da mucosa epitelial do intestino são altamente dependentes de energia; caso haja redução no suprimento sanguíneo e na oxigenação dos tecidos, pode ocorrer rápida formação de lesão e morte (MOORE et al., 1995).

O mecanismo anteriormente descrito pode ocorrer tanto com o estrangulamento venoso como artério-venoso. O epitélio que reveste as vilosidades se desprende de sua membrana basal, enquanto células epiteliais permanecem ligadas umas às outras se desprendendo em grupos, começando no topo das vilosidades em direção às criptas. À medida que a hipóxia continua, as alterações degenerativas se intensificam e dentro de quatro a cinco horas ocorre completa necrose do epitélio da mucosa. Após seis ou sete horas os efeitos da hipóxia já se estenderam pela camada muscular externa, podendo levar à perfuração do segmento (ALLEN & TYLER, 1990).

Contudo, os mecanismos que levam à lesão da mucosa intestinal são bem mais complexos. Nos eqüinos, as vilosidades intestinais possuem uma arteríola central, que se ramifica próximo ao topo das mesmas, drenando para as

vênulas periféricas (DART et al., 1992). Esta arquitetura vascular promove um mecanismo de troca contracorrente, onde o oxigênio se difunde desde a arteriola central para os tecidos e vênulas adjacentes periféricas. Nos estágios iniciais de estrangulamento, quando o fluxo arterial está reduzido, as extremidades das vilosidades se tornam progressivamente hipóxicas, resultando em lesão epitelial. Portanto, a lesão isquêmica de mucosa leva a um desprendimento tempo-dependente do epitélio, desde as extremidades das vilosidades em direção às criptas (SHEPHERD & GRANGER, 2001). A perda da barreira da mucosa intestinal permite que bactérias e endotoxinas atinjam a cavidade abdominal, provocando um aumento do número de neutrófilos no líquido peritoneal. As alterações isquêmicas levam à formação de necrose, a menos que o fluxo sanguíneo retorne. Em caso de necrose severa, bactérias podem ser encontradas na cavidade peritoneal, ou no interior de neutrófilos e o líquido peritoneal pode se tornar sero-sangüinolento (WHITE, 2003).

Mesmo quando a perfusão esplâncnica é restabelecida antes da ocorrência de necrose, o processo degenerativo continua e progride. Este mecanismo é conhecido como injúria de reperfusão (ALLEN & TYLER, 1990). Este conceito é baseado em achados experimentais nos quais a lesão da mucosa se agrava através da reperfusão de uma área isquêmica. É um conceito que parece contraditório, já que a lesão isquêmica da mucosa é resultante da ausência de fluxo de sangue oxigenado (KUBES et al., 1992; KURTEL et al., 1991; ZIMMERMAN & GRANGER, 1990).

Em condições normais o ATP é metabolizado em adenosina, inosina e hipoxantina. A xantina desidrogenase, uma enzima encontrada nas células endoteliais, converte a hipoxantina em xantina e ácido úrico, sendo o último posteriormente eliminado pelos rins (Figura 1A). Durante a isquemia, a ausência de oxigênio resulta em glicólise anaeróbica, que promove um acúmulo de ácido láctico no interior das células e consequentemente, uma acidose intracelular, que por sua vez inibe a produção de ATP. Com isso, a célula passa a metabolizar as reservas de ATP intracelulares pré-existentes, levando a um aumento de hipoxantina no seu interior. A falta de energia disponível provoca redução na função das bombas de  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , as quais são importantes na manutenção do balanço adequado de íons intra e extracelulares. A falha no funcionamento

dessas bombas acarreta um influxo de cálcio para o interior das células. O aumento do cálcio inicia a conversão de xantina desidrogenase em xantina oxidase por uma protease chamada calpaína cálcio-dependente (COHEN, 1989). Durante a reperfusão, a reintrodução de oxigênio catalisa a oxidação pela xantina oxidase da hipoxantina acumulada em xantina e ácido úrico, mas desta vez com formação de um radical superóxido, conforme esquematizado na figura 1B (FLAHERTY & WEISFELDT, 1988). Embora os radicais superóxido não causem danos diretamente aos tecidos por não serem consideravelmente lipossolúveis, os mesmos desencadeiam a liberação de fatores quimiotáticos como o leucotrieno B<sub>4</sub> e fator ativador de plaquetas (PAF) (MOORE, 1997), que por sua vez tem a capacidade de induzir a produção de TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral), outro mediador da inflamação. A liberação de agentes quimiotáticos resulta em rápida agregação de neutrófilos na região pós-isquêmica (GRANGER et al., 1986; GRISHAM et al., 1986; ZIMMERMAN et al., 1990).

Os radicais livres de oxigênio são produzidos em condições normais durante o metabolismo celular e podem lesar células. Entretanto, agentes antioxidantes normalmente presentes nas células protegem as mesmas contra a formação das lesões. Os radicais superóxido são usualmente convertidos em peróxido de hidrogênio pela enzima superóxido dismutase endógena que degrada o mesmo em água (FLAHERTY & WEISFELDT, 1988). Em casos de reperfusão, ocorre uma sobrecarga dos mecanismos endógenos, o que permite que os radicais livres e seus metabólitos causem lesão celular. Nesses casos há formação de radicais hidroxil (OH<sup>-</sup>), os quais são ativos contra membranas celulares, causando distúrbios no metabolismo celular. Os radicais livres de oxigênio também provocam danos aos tecidos por meio da peroxidação lipídica das membranas celulares e organelas intracelulares, resultando em lise celular (MOORE et al., 1995). Além disso, as enzimas celulares são inativadas e as fitas de DNA são quebradas devido à oxidação pelos radicais livres de oxigênio (ERNSTER, 1988).

Entre os radicais livres produzidos durante a isquemia e reperfusão, o óxido nítrico (NO) exerce um papel importante. Ele normalmente é sintetizado pela L-arginina através da NO sintetase (NOS) a qual possui isoformas constitutiva (ecNOS) e induzível (iNOS) (CERQUEIRA & YOSHIDA, 2002). A

produção excessiva de NO pela iNOS contribui para a fisiopatologia da lesão de reperfusão no intestino (CUZZOCREA et al., 2002; MONTALTO et al., 2003). Entretanto, a produção de NO pela ecNOS pode representar uma molécula protetora importante para o intestino delgado em casos de I/R. O óxido nítrico possui efeitos vasodilatadores benéficos no sistema microvascular por meio do relaxamento das células da musculatura vascular lisa, mas contraditoriamente pode estar envolvido na produção de radicais citotóxicos (CHAN et al., 1999). Portanto, o óxido nítrico é benéfico como um modulador ou mensageiro, mas durante o estresse oxidativo pode ser potencialmente tóxico (SEKHON et al., 2003). Por outro lado, tecidos submetidos à isquemia e reperfusão podem sofrer redução nos níveis de NO devido à inativação da NOS e do próprio NO pelo superóxido produzido nesses tecidos (KUROSE et al., 1994). Além disso, a destruição das células endoteliais, que são fonte de NO, por radicais livres também pode causar redução dos níveis de NO (ANDREWS et al., 1994).

A migração e acúmulo de neutrófilos no interstício podem causar uma segunda fase de injúria de reperfusão. Quando os neutrófilos são ativados, eles degranulam e liberam radicais livres, proteases e ácido hipocloroso, que podem levar a uma lesão vascular e de mucosa (KUBES et al., 1992; MOORE et al., 1995). Os mastócitos, bem como as reações induzidas por eles, parecem contribuir para o aumento da permeabilidade da mucosa durante a reperfusão, embora suas funções exatas na injúria de reperfusão ainda não tenham sido esclarecidas (ZHANG et al., 2004). Existem evidências de que os polimorfonucleares (PMNs), as células endoteliais, além de outras células, exercem funções significativas na patogenia da injúria de reperfusão (MASSBERG et al., 1998).

A produção de radicais livres superóxido pelos neutrófilos se dá via sistema dinucleotídeo adenina nicotinamida fosfato (NADPH) (FLAHERTY & WEISFELDT, 1988), que catalisa a redução do oxigênio ao ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. A produção desses componentes oxidantes é o principal mecanismo pelo qual os neutrófilos fagocitam e subseqüentemente destroem os microorganismos (KLEBANOFF, 1988).

As plaquetas são utilizadas pela microvasculatura pós-isquêmica logo após o início da reperfusão e, mesmo sendo anucleadas, também podem gerar

radicais livres, liberar mediadores pro-inflamatórios como TXA<sub>2</sub> (mediador vasoativo e constrictor do músculo liso, é um metabólito do ácido araquidônico), leucotrienos, serotonina, fator plaquetário-4 e PDGF (fator de crescimento derivado das plaquetas), além de modular a função leucocitária. Portanto, o acúmulo de plaquetas na microvasculatura pode contribuir显著mente para a manifestação das lesões de reperfusão (MASSBERG et al., 1998).

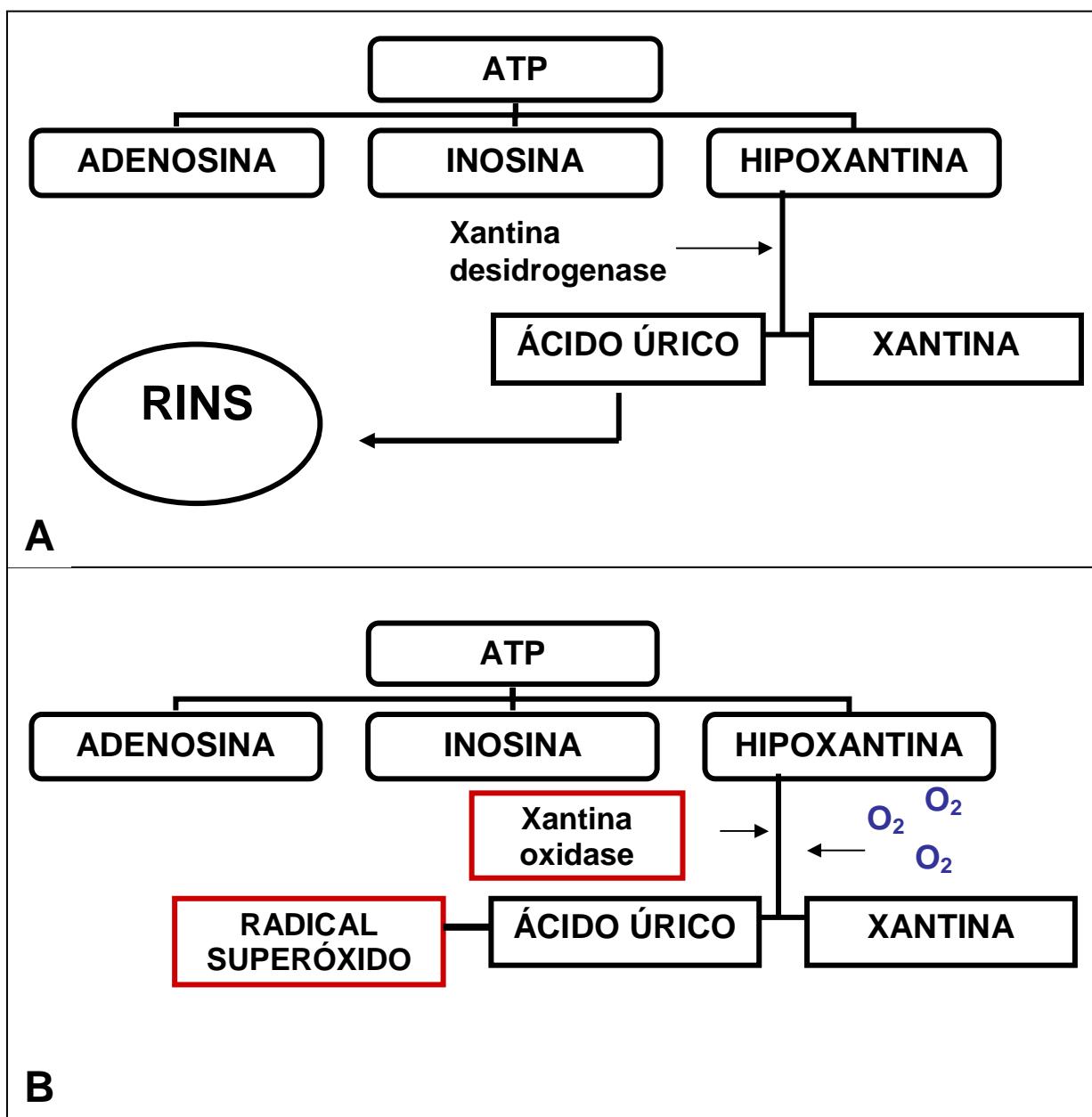


FIGURA 1- Representação esquemática da conversão da hipoxantina em xantina e ácido úrico. (A) Conversão realizada pela enzima xantina desidrogenase em condições fisiológicas. (B) Quando há reperfusão ocorre conversão realizada pela enzima xantina oxidase com formação de um radical superóxido, reação catalisada pelo oxigênio.

### 2.3 Apoptose no intestino

A necrose tem sido atribuída como a forma de morte celular resultante da injúria de isquemia e reperfusão. Entretanto, pesquisas indicam que uma outra forma de morte celular conhecida como apoptose estaria envolvida. Um estudo mostrou que a isquemia e reperfusão experimental do íleo de ratos induz à apoptose (NODA et al., 1998).

A necrose celular é caracterizada por mudanças resultantes da falta de oxigenação, enquanto a apoptose resulta de uma sinalização intracelular que inicia a transcrição de genes específicos. A necrose celular normalmente atinge grupos de células ou órgãos inteiros, enquanto a apoptose atinge células individuais de um tipo altamente específico (JONES, 1997).

Ao contrário da necrose, a apoptose é um processo ativo de autodestruição celular caracterizada por mudanças morfológicas, tais como: condensação da cromatina, diminuição do tamanho da célula com organelas permanecendo intactas e eventual fragmentação do núcleo e citoplasma para formar os corpos apoptóticos (CHANG et al., 2002; FU et al., 1997). Um experimento realizado em eqüinos mostrou que animais acometidos por estrangulamento do intestino delgado apresentam grande número de células apoptóticas, possivelmente devido à lesão isquêmica e inflamação subsequente (ROWE et al., 2003). Embora a apoptose que ocorre como parte da função intestinal normal não leve ao desenvolvimento de uma processo inflamatório, a apoptose excessiva induzida experimentalmente provoca resposta inflamatória (SUN et al., 1998).

### 2.4 MAP Quinases

Existem grandes evidências de que as MAP quinases são ativadas durante a isquemia e/ou reperfusão e podem contribuir com mudanças estruturais e funcionais do órgão afetado (ABE et al., 2000).

O controle da divisão e diferenciação celulares é mediado por interações de moléculas de sinalização na superfície celular, o que por sua vez,

leva a mudanças em longo prazo na expressão de genes. Na maioria das células, as MAPKs, as quais fazem parte de um grupo de enzimas citoplasmáticas da família das proteínas quinases serina-treonina, transmitem os sinais mitogênicos e de diferenciação celular (ALIAGA et al., 1999). Essas enzimas são ativadas em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares, tais como LPS (lipopolissacarídeos), hipóxia e liberação de citocinas inflamatórias (PEARSON et al., 2001) e regulam atividades celulares tais como expressão de genes, diferenciação celular, embriogênese, mitose, movimento, metabolismo e morte programada (JOHNSON & LAPADAT, 2002). As três principais MAPKs que participam do mecanismo de sinalização, incluem a via ERK, p38 e JNK, as quais têm sido identificadas nas células dos mamíferos (YUE et al., 2000). A ativação da MAPK-p38 e JNK está geralmente associada à apoptose, enquanto que ERK 1/2 ativadas possuem função protetora, ou seja de inibir a atividade da apoptose (CROSS et al., 2000; YUE et al., 2000). ERK 1 e 2 são expressas amplamente e estão envolvidas na regulação de mitose, meiose e funções pós-mitóticas em células diferenciadas (JOHNSON & LAPADAT, 2002).

As MAPK constituem um módulo de três quinases, formando um sistema regulatório que estabelece uma via seqüencial de ativação de proteínas quinase: a MAP quinase quinase quinase (MAPKKK), a MAP quinase quinase (MAPKK) e a MAP quinase. Os sinais em geral são transmitidos por meio de fosforilação seqüencial e ativação desses componentes (WHITMARSH & DAVIS, 1999). O primeiro componente do módulo MAPKKK pode ser ativado tanto por fosforilação quanto por interação com uma proteína de ligação chamada GTP da família Ras ou Rho. As MAPKKK são quinases serina/treonina que, quando ativadas, fosforilam e ativam a próxima quinase no módulo, a MAP quinase quinase (MAPKK). As MAP quinases (MAPK) constituem a quinase final no módulo de ativação e fosforilam seus substratos em resíduos de serina e treonina. A grande maioria dos substratos das MAPK é formada por fatores de transcrição. As MAPK podem ser categorizadas em cinco sub-famílias: MAPK-ERK 1/2, MAPK-p38, MAPK-JNK, MAPK-ERK 5 e as MAPK ERK 3/4. As MAPK nomeiam a via de transdução de sinal onde são empregadas, isto é, via da ERK 1/2, via da MAPK-p38, etc. As MAPK são direcionadas à prolina, pois fosforilam substratos que contenham uma prolina no sítio P-1. Um consenso geral para as MAPK-ERK

1/2 é Pro-X-Ser-/Thr-Pro. A atividade das MAPK é controlada pela dupla fosforilação de uma seqüência de aminoácidos conhecida por alça de ativação. As MAPKK são quinases que reconhecem e fosforilam um motivo Thr-X-Tyr (treonina-aminoácido X-tirosina) na alça de ativação da MAPK, o que define as MAPKK como sendo quinases de dupla especificidade. A seqüência Thr-X-Tyr na alça de ativação, onde X representa diferentes aminoácidos entre os diversos tipos de MAPK, é o sítio para a dupla fosforilação e corresponde a Thr-183 e Tyr-185. A dupla fosforilação desses sítios resulta em um aumento da atividade específica da MAPK em mais de 1000 vezes (WIDMANN et al., 1999).

Os mesmos autores acima citados ainda revisaram detalhadamente a via da MAPK ERK 1/2. A via da quinase regulada extracelularmente (ERK) tem como principal MAPKKK a isoforma Raf-1 (ou c-Raf), enquanto que a MAPKK desta via é constituída das isoformas MEK 1/2. Raf-1 faz parte da família das isoformas Raf que são proteínas capazes de fosforilar MEKs em uma cascata única (KYRIAKIS et al., 1992). Esta via constitui uma cascata de eventos de ativação enzimática por meio de fosforilações que resultam em ativação da ERK 1/2 e seus substratos. Quando o receptor tirosina quinase (RTK) é estimulado, os domínios tirosina quinase intrínsecos são ativados, resultando na fosforilação em tirosina de substratos específicos, incluindo eles mesmos. A fosforilação em tirosina do RTK permite que a ele se liguem proteínas de adaptação. Tais proteínas apresentam em suas seqüências de aminoácidos motivos específicos envolvidos em interações proteína-proteína. A proteína de adaptação Shc consiste em um domínio de ligação de fosfotirosina (PTB), domínio de homologia 2 Src (SH2) – que assim como PTB se liga a resíduos de fosfotirosina- e domínio de homologia 3 Src (SH3). Após a ativação do RTK, Shc liga-se a uma fosfotirosina específica do receptor por meio do domínio PTB. A associação de Shc com o receptor permite a fosforilação em tirosina de Shc pelo próprio RTK ou por uma outra quinase intracelular como Src. Essa fosforilação permite a ligação de outra proteína de adaptação Grb2, que é formada por um domínio SH2 e dois domínios SH3. A associação entre Shc e Grb2 é mediada pelo domínio SH2 de Grb2. Essas associações amplificam a quantidade de Grb2 integradas ao receptor. Como o fator de troca de nucleotídeo guanina Sos (*son of sevenless*) liga-se constitutivamente ao domínio SH3 de Grb2, a ligação de Grb2 com o RTK

também recruta Sos. A ligação de Sos ao RTK também leva a uma troca de Ras-GDP por GTP na membrana plasmática. Ras-GTP interage com MAPKKK 9 (também conhecida como Raf-1), ligando-se ao domínio regulador N-terminal da quinase. Ras-GTP dirige Raf-1 para a membrana plasmática onde a quinase é ativada por fosforilação em tirosina em Tyr-340 e Tyr-341 por quinases ligadas à membrana, como por exemplo, Src. Raf-1 ativado pode fosforilar as MAPKK da via ERK 1/2. MEK 1/2 são altamente homólogas em seqüência primária de aminoácidos, funcionando como uma serina/treonina quinase de dupla especificidade. ERK 1/2 possuem uma seqüência The-Glu-Tyr na alça de ativação do domínio catalítico da quinase que é fosforilada por MEK 1/2 ativadas. As MEK 1/2 possuem um sinal de exportação nuclear que as mantém fora do núcleo. Foi proposto que MEK-1 em estado inativo seqüestra ERK 1/2 no citoplasma. ERK 1/2 ativada rapidamente transloca-se para o núcleo, onde é funcionalmente seqüestrada e regula a atividade de proteínas nucleares, incluindo fatores de transcrição. A inativação de ERK requer a sua desfosforilação por fosfatasas específicas; a forma desfosforilada retorna ao citoplasma e se associa novamente à MEK 1/2. As fosfatasas que desativam ERK 1/2 incluem MKP-1 (CL-100) e MKP-3 (Pyst 1), que podem desfosforilar o motivo Thr (P)-Glu-Tyr (P) de ERK 1/2 ativadas. Enquanto MKP-1 é localizada no núcleo, MKP-3 é primariamente citoplasmática (WIDMANN et al., 1999). A figura 2 representa esquematicamente a via de transdução de sinal da MAPK-ERK 1/2.

## 2.5 ERK e apoptose

Um experimento realizado com culturas de cardiomiócitos submetidos à isquemia e reperfusão, onde a ativação de ERK foi inibida com PD98059, resultou em um aumento do número de células apoptóticas. Esse resultado sugere que a ativação de ERK tem um papel importante na prevenção da apoptose induzida pela isquemia e reperfusão (YUE et al., 2000).

O mecanismo da apoptose envolve componentes múltiplos, além de um elemento central da família das proteínas Bcl-2 (GREEN & REED, 1998; THORNBERRY & LAZEBNIK, 1998). Essas proteínas têm múltiplos locais de

fosforilação, portanto acredita-se que várias proteínas kinases estejam envolvidas na regulação das Bcl-2. De fato, a fosforilação de Bcl-2 e Bcl-X<sub>L</sub> pelas ERKs já foi observada, embora os efeitos de sua atividade antiapoptótica ainda não tenham sido totalmente elucidados (ITO et al., 1997; MORIYAMA et al., 1997). Isso sugere que as ERKs atuam à montante em relação à família de proteínas Bcl-2 (MORIYAMA et al., 1997).

Raf-1, considerado um dos principais componentes do mecanismo de ativação de ERK, é também um dos fatores mais importantes na prevenção da apoptose. Estudos mostraram que Bcl-2 pode direcionar Raf-1 para a mitocôndria e que Raf-1 ativo ligado às seqüências alvo das proteínas da membrana externa da mitocôndria protege a célula contra apoptose (WANG et al., 1996).

As ERK são ativadas em resposta aos estímulos dos fatores de crescimento, o que é essencial para a proliferação e diferenciação celular (MANSOUR et al., 1994); além disso, outros trabalhos comprovaram que a ativação dos mecanismos de sinalização das ERK está relacionada à sobrevivência das células (XIA, Z. et al., 1995).

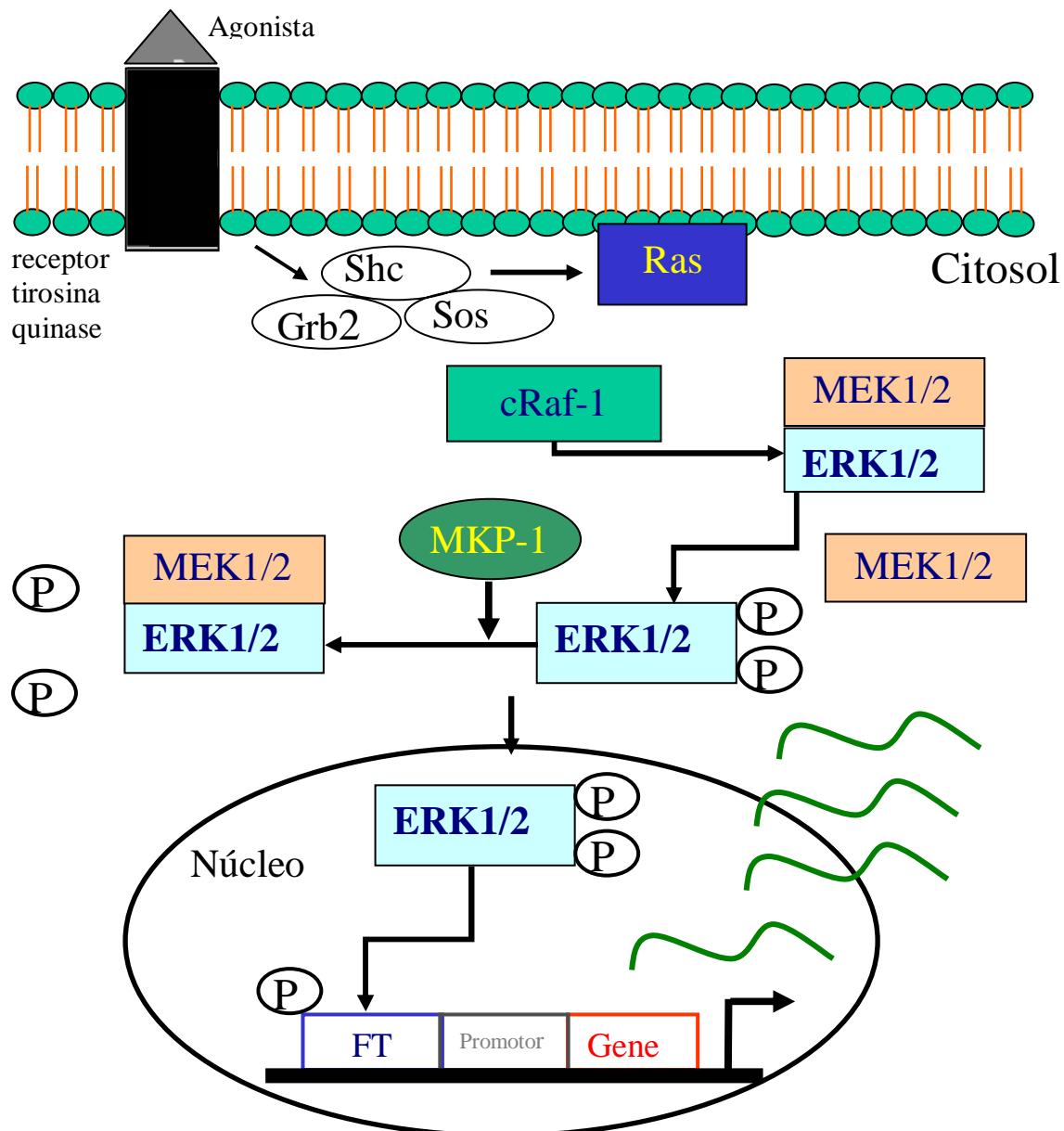


FIGURA 2 - Representação esquemática da via de transdução de sinal da MAP quinase ERK 1/2. Quando um agonista (como o TNF- $\alpha$ , por exemplo) liga-se ao receptor tirosina quinase, ocorre uma auto-fosforilação e coaptação de um complexo de proteínas (Shc/Grb2/Sos) que ativa Ras próximo à membrana. Ras ativa c-Raf-1, ou MAP quinase quinase, que por sua vez fosforila a próxima quinase do módulo, MEK 1/2 (MAP quinase quinase). MEK 1/2 forma um complexo citoplasmático com ERK 1/2 (MAP quinase) inativa; quando MEK fosforila ERK, as duas se separam, e ERK activada transloca-se rapidamente para o núcleo, onde fosforila substratos tais como fatores de transcrição (FT), incrementando a transcrição de genes envolvidos em processos como contração de musculatura estriada e lisa, inflamação e edema, controle do tônus vascular, sobrevivência e função do miocárdio. A fosfatase MKP-1 defosforila e desativa ERK 1/2, que novamente forma um complexo com MEK1/2.

Fonte: Araújo (2001)

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Estabelecer o perfil de ativação das MAPK ERK 1/2 no intestino delgado de eqüinos submetidos à isquemia e reperfusão.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Determinar a existência de níveis constitutivos de ativação das MAPK ERK 1/2 no intestino de eqüinos, por meio da técnica de imunohistoquímica;
- Determinar a localização histológica da ativação da MAPK ERK 1/2 no intestino de eqüinos submetidos à isquemia e reperfusão.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Local de realização

O alojamento dos animais, procedimentos cirúrgicos para colheita de amostras, a realização de exames laboratoriais e a técnica de imunoistoquímica foram desenvolvidos no Hospital Veterinário da Sociedade Objetivo de Ensino Superior em Goiânia, Goiás.

O processamento das amostras coletadas, preparação das lâminas e coloração com HE foram realizados no setor de patologia da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

### 4.2 Animais em experimentação

Foram utilizados sete animais da espécie eqüina, sem raça definida, sendo quatro machos e três fêmeas, de três a 20 anos de idade, com peso corpóreo variando entre 250 e 350 Kg. Como os eqüinos eram procedentes do centro de zoonoses da cidade de Goiânia, não havia histórico de cada um deles; portanto, a determinação da idade foi feita baseada na cronologia dentária (MARTIN et al., 1999). Os animais foram identificados pelas letras A, B, C, D, E, F e G.

A utilização dos animais para a realização do presente trabalho foi feita de acordo com as normas estabelecidas pelo (COBEA) Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (GOLDENBERG, 2000) e Código de Ética no Uso Científico de Animais (DUNIN & SOUZA, 1996).

Todos os eqüinos utilizados no estudo experimental foram submetidos a exame físico, além de hemograma, conforme rotina do laboratório de análises clínicas do Hospital Veterinário da Sociedade Objetivo de Ensino Superior, para certificação das condições de higidez orgânica. Os animais foram medicados com sulfóxido de albendazol e triclorfon (Ricobendazole gel, Produtos Veterinários Ouro Fino Ltda, São Paulo) por via oral para controle de verminose, foram

mantidos por dez dias em baias limpas com área de 4x4 metros cada, piso de borracha e alimentados com feno de *coast cross* e água à vontade. Todos os eqüinos foram submetidos a um jejum alimentar por 12 horas antes da cirurgia.

Para a indução anestésica, foram utilizados xilazina na dose de 0,5 mg/Kg de peso vivo (Calmium, União Química Farmacêutica Nacional S/A, São Paulo), quetamina na dose de 2,2 mg/Kg de peso vivo (Dopalen, Sespo Indústria e Comércio LTDA/ Divisão Vetbrands Saúde Animal, São Paulo) e éter gliceril guaiacol na dose de 55 mg/Kg de peso vivo (Guaifenesina, Farmos Indústria e Comércio Ltda, Rio de Janeiro). Os animais foram posicionados em decúbito dorsal. Na manutenção da anestesia foram utilizados halotano (Halotano, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, São Paulo) em oxigênio em sistema semi-fechado com ventilação espontânea. A pressão arterial foi monitorada através de um manômetro conectado a um cateter na artéria facial. Solução de Ringer (Halexistar Indústria Farmacêutica Ltda, Goiás) foi administrada via intravenosa, por meio de cateterização da veia jugular, num fluxo aproximado de 5 a 10 ml/Kg/h com a finalidade de manter a pressão arterial acima de 70 mm Hg, enquanto os animais eram mantidos em decúbito dorsal. Duzentos e cinqüenta miligramas de cloridrato de dobutamina (Neobutamina, Laboratório Neo Química Com. e Ind. Ltda, Goiás) foram diluídos em 500 ml de Solução glicosada 5% (Halexistar Indústria Farmacêutica Ltda, Goiás) e utilizados num fluxo aproximado de uma gota por segundo, sempre que necessário para auxiliar na manutenção da pressão arterial. O monitoramento anestésico também incluiu eletrocardiografia e oximetria.

#### **4.3 Procedimento cirúrgico**

O procedimento cirúrgico foi realizado sob condições assépticas de rotina. Uma incisão de 30 cm na linha alba cranial à cicatriz umbilical foi realizada contemplando pele, tecido subcutâneo, gordura retroperitoneal e peritônio para adentrar o abdome. A cavidade peritoneal foi explorada e o ceco exteriorizado. Segundo a tênia dorsal do ceco do seu ápice em direção à base, o íleo foi identificado próximo à junção ileocecocólica e seguido dois metros oralmente para

a identificação da porção distal do jejuno. Um segmento de 30 cm do jejuno foi isolado e posicionado sobre um colchão térmico envolvido por saco plástico estéril, com a finalidade de manter o segmento aquecido a uma temperatura aproximada de 38º C. A artéria e veia jejuna responsáveis pelo suprimento sanguíneo deste segmento foram identificadas e isoladas na porção proximal à ramificação na arcada mesentérica por meio de dissecação do mesentério. Solução fisiológica 0,9% (Halexistar Indústria Farmacêutica Ltda, Goiás) aquecida a 37º foi utilizada para manter o segmento hidratado.

Pinças vasculares de *Kocher* receberam um revestimento de tubo de látex (figura 3) em suas extremidades e foram posicionadas na artéria e veia jejuna, provocando oclusão desses vasos. Tubos de látex foram colocados nas extremidades do segmento isolado (figura 3) visando ocluir o lúmen e a vasculatura mural e bloquear a circulação colateral. Além disso, os pequenos vasos provenientes de ramificações da arcada mesentérica adjacentes foram ligados com fio catgut cromado número zero (Shalon Fios Cirúrgicos Ltda, Goiás).

A isquemia teve duração de 60 minutos. Em seguida as pinças, tubos de látex e fios de sutura foram removidos e o segmento intestinal permaneceu em reperfusão por duas horas. O segmento em estudo permaneceu fora da cavidade peritoneal durante todo o procedimento.

Ao final do procedimento cirúrgico, enquanto ainda anestesiados, os animais foram sacrificados utilizando-se 50 g de cloreto de potássio PA (Revitec, Produtos para Laboratórios, São Paulo) diluídos em 100ml de Solução fisiológica (Halexistar Indústria Farmacêutica Ltda, Goiás) via intravenosa rápida. Os animais permaneceram conectados ao sistema semi-fechado de anestesia até ser observada pela eletrocardiografia a ausência total de impulsos elétricos.

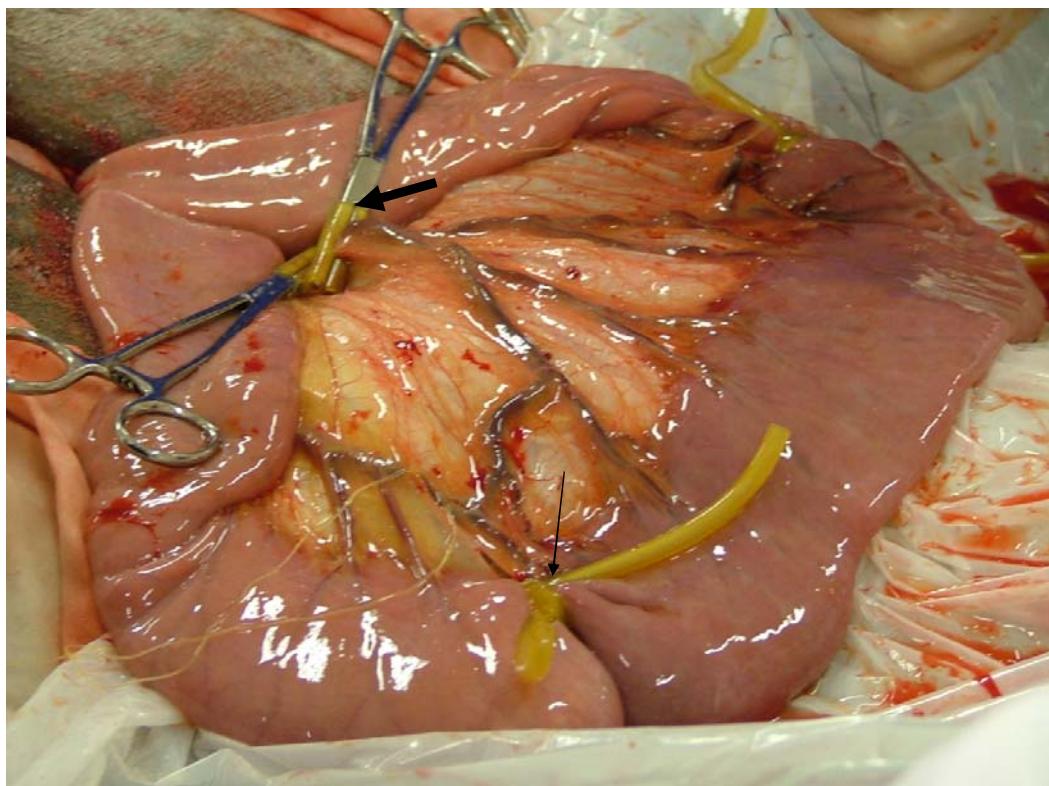


FIGURA 3- Segmento isolado de jejuno de eqüinos mostrando o revestimento de látex em pinças de Kocher (seta larga) e tubos de látex posicionados nas extremidades do segmento para bloquear a circulação mural (seta).

#### 4.4 Amostras

Para a colheita das amostras foram utilizados dois pontos de fixação na borda anti-mesentérica do segmento isolado utilizando fio de algodão/poliéster 0 (Shalon Fios Cirúrgicos Ltda, Goiás), estabelecendo uma distância aproximada de cinco centímetros entre eles. Uma tesoura *Metzenbaum* foi utilizada para colher os fragmentos, que incluíam todas as camadas da parede do jejun. Os fragmentos foram imediatamente identificados e acondicionados em formol tamponado a 10%. A região incidida do jejun foi suturada com fio catgut cromado número zero (Shalon Fios Cirúrgicos Ltda, Goiás) em um plano de sutura tipo Cushing. As amostras foram colhidas em cinco momentos diferentes:

- amostra 1: antes da oclusão dos vasos (controle do próprio animal);
- amostra 2: cinco minutos após o início da isquemia;

- amostra 3: cinco minutos após o início da reperfusão;
- amostra 4: 60 minutos após o início da reperfusão;
- amostra 5: 120 minutos após o início da reperfusão.

## 4.5 Processamento das amostras

As amostras foram fixadas por 24 horas em formol tamponado a 10%, recortadas e mantidas em álcool 70% até serem desidratadas e impregnadas em blocos de parafina. Com um micrótomo foram feitos cortes com 5 micrômetros de espessura das amostras incluídas em parafina.

Os cortes foram montados em lâminas, corados com Hematoxilina e Eosina (HE) e submetidos à análise por microscopia óptica, onde foram avaliadas alterações tais como: edema, hemorragia, infiltrado de leucócitos, degeneração celular e perda da conexão com células vizinhas. Foram utilizados escores variando de zero a três, sendo zero a ausência total de alterações, um para alterações brandas, dois para moderadas e três para alterações intensas.

Foram realizados também testes de imunoistoquímica com emprego de anticorpos que reconhecem especificamente as formas fosforiladas das MAP quinases p44/42 (ERK 1/2).

### 4.5.1 Imunoistoquímica

Cada lâmina previamente preparada com organosilano (3-aminopropyl triethoxysilane, Sigma Inc., Missouri) continha dois cortes: um positivo que passou por todas as etapas previstas no teste e um negativo que recebeu PBS (tampão fosfato) no lugar do anticorpo primário.

Os níveis de expressão das formas fosforiladas (ativadas) de ERK 1/2 foram investigados utilizando o método avidina-biotina descrito a seguir (ARAÚJO, 2001):

- Desparafinização em xanol;
- Reidratação em álcool a 100%, 70% e água destilada;

- Bloqueio das peroxidases endógenas com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (15 min);
- Recuperação antigênica em tampão citrato de sódio (2,94 g citrato de sódio em um litro de água destilada, 500 µl de TWEEN 20, pH 6,0) em panela de pressão por seis minutos (a partir do momento em que a panela começa a emitir o som decorrente do aumento da pressão interna);
- Bloqueio de ligações inespecíficas com BSA (albumina bovina sérica) a 3%;
- Incubação com anticorpo primário policlonal anti-phospho-p44/42 produzido em coelhos (Cell Signalling Technology, Inc., Massachusetts, EUA), que reconhece as formas fosforiladas de p44/42 (ERK 1/2) na diluição de 1:1000 em BSA 1,5%, em câmara úmida na geladeira por aproximadamente 16 horas.
- Incubação com o anticorpo secundário biotinilado anti-coelho (Cell Signalling Technology, Inc., Massachusetts), na diluição de 1:500 em BSA 1,5%, em temperatura ambiente por 30 minutos;
- Incubação com complexo Avidina-Biotina ABC (Vecto Laboratories, Inc., California) por 30 minutos;
- Revelação utilizando substrato cromógeno 3,3 diaminobenzidine-DAB (Dako Colorado, Inc., Colorado) por três minutos;
- Contracoloração com hematoxilina de Harris (30 segundos)
- Lavagem em água destilada;
- Desidratação em série crescente de álcool;
- Montagem das lâminas com Entellan (Merck, Darmstadt) e lamínula.

Os resultados da marcação positiva para as formas fosforiladas de ERK foram analisados por microscopia óptica utilizando-se objetiva de aumento de 40, 100 e 400 vezes. A marcação em cada corte foi comparada com o seu controle correspondente (negativo). A ausência de marcação no corte negativo foi utilizada para comprovar a ligação do anticorpo primário nas áreas marcadas do corte positivo correspondente.

Para avaliar os resultados qualitativos criou-se um índice que traduzia a intensidade da ativação (marcação) dessas MAPK nas diferentes camadas do intestino delgado (Quadro1).

QUADRO 1- Critérios de avaliação para os testes de imunoistoquímica

CATEGORIAS	INTENSIDADE DA MARCAÇÃO	VALOR ATRIBUÍDO
-	nenhuma	0
+	leve	1
++	moderada	2
+++	intensa	3

#### 4.6 Análise estatística

Os dados coletados dos testes de imunoistoquímica produziram respostas de caráter qualitativo, que após terem sido transpostos para valores quantitativos, representaram uma resposta de natureza categórica (escores). Para a avaliação dessas variáveis foi utilizada a estatística descritiva calculando-se média e desvio padrão. O teste de Kruskal Wallis (Sampaio, 1998) com nível de significância de 5% ( $P<0,05$ ) foi aplicado para verificar a presença de diferença significativa entre os escores da camada muscular longitudinal.

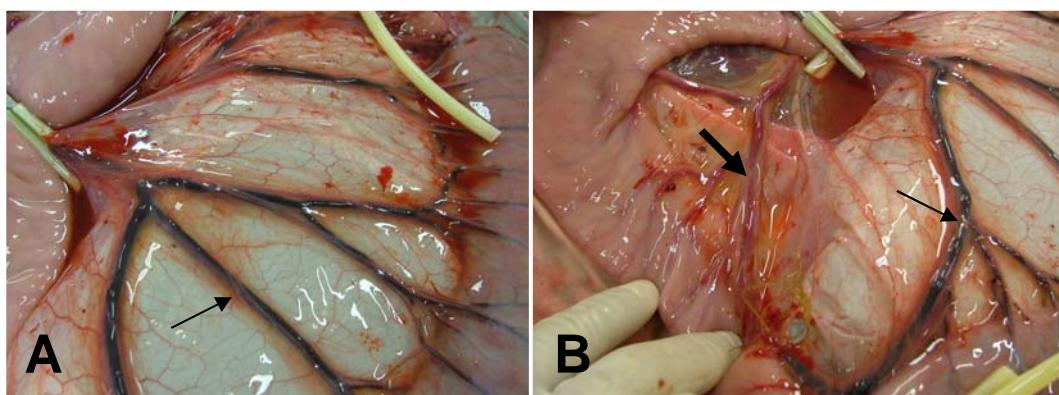
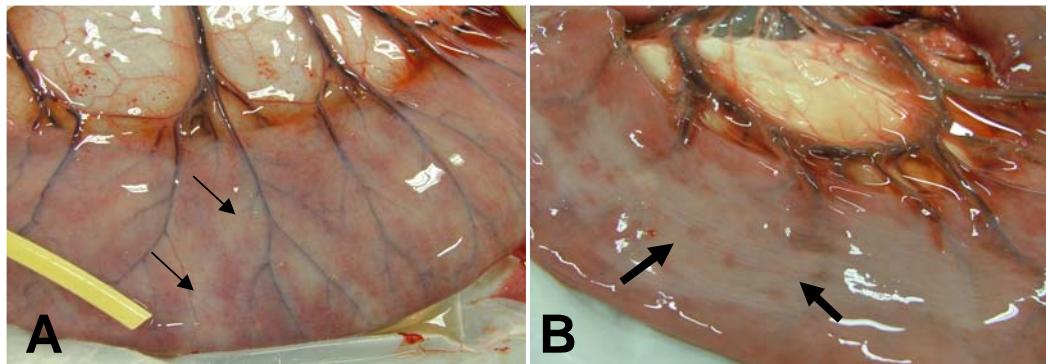
## 5 RESULTADOS

As principais alterações encontradas no hemograma dos animais foram os baixos valores para hematócrito e contagem de hemácias. Quatro animais apresentaram hematócrito variando entre 20 e 25% e três animais tiveram esses resultados variando entre 30 e 32%.

### 5.1 Alterações macroscópicas

As primeiras alterações macroscópicas foram observadas aos cinco minutos de isquemia. Todos os animais apresentaram variação na coloração do segmento intestinal isolado que se intensificou no decorrer do processo de isquemia (Figura 4A); um animal apresentou serosa de coloração pálida e ligeiramente cianótica, cinco animais apresentaram coloração cianótica com áreas de palidez e um animal apresentou coloração cianótica intensa. Em seis animais o segmento retornou à coloração normal alguns minutos após a reperfusão. Porém, em um animal as alterações na coloração se intensificaram durante todo o período de reperfusão (Figura 4B). As veias jejunais apresentavam-se bastante ingurgitadas e escuras à medida que o tempo de isquemia aumentava (Figura 5).

Aos 60 minutos de isquemia, um animal apresentou um pequeno número de petéquias visíveis na serosa e dois animais apresentaram grande quantidade de petéquias visíveis no mesentério do segmento isquêmico. Quatro animais apresentaram espessamento discreto e dois apresentaram espessamento intenso da parede intestinal a partir do final do período de isquemia que se intensificou durante a reperfusão. O aspecto brilhante da serosa do segmento isolado nos animais que apresentaram espessamento da parede intestinal (Figura 4) era visível.



## 5.2 Estudo microscópico

As principais alterações observadas nas camadas do intestino delgado foram: infiltrado de leucócitos, edema, hemorragia e degeneração celular.

Intenso infiltrado de eosinófilos estava presente na base da mucosa e submucosa de todos os animais. Apenas um animal apresentou hemorragia severa na mucosa e submucosa a partir da colheita da terceira amostra.

As alterações morfológicas observadas nas vilosidades foram mínimas. Os enterócitos das vilosidades apresentaram leve degeneração a partir das

amostras de número dois e esta não progrediu ao longo da reperfusão do segmento.

A alteração mais visível entre as camadas avaliadas foi o edema na base da mucosa (Figura 6C). Esta alteração não estava presente nas amostras de número um, apresentava-se de forma branda à colheita da segunda amostra e bastante intensa em todos os momentos seguintes. Edema discreto na lâmina própria foi observado a partir dos cinco minutos de reperfusão e manteve-se discreto na maioria dos animais nos momentos seguintes. Um animal apresentou edema intenso nesta região (Figura 6D).

A muscular da mucosa exibiu discreta degeneração celular a partir dos cinco minutos de isquemia, tornando-se moderada após duas horas de reperfusão.

A camada submucosa apresentou edema leve já no momento da colheita número um, tornou-se moderado após cinco minutos de reperfusão e intenso após uma hora de reperfusão (Figura 7A). Em dois animais foram encontrados macrófagos na submucosa contendo hemossiderina (Figura 7B). As células do plexo mioentérico não sofreram alterações significativas ao longo do processo de isquemia e reperfusão.

Na camada muscular circular foram observados edema e degeneração progressivos, os quais se tornaram intensos após duas horas de reperfusão (Figuras 6A e 6B). Já a camada muscular longitudinal (externa) mostrou um grau mais brando de edema a partir dos cinco minutos de isquemia, chegando a moderado após duas horas de reperfusão. Esta mesma camada sofreu alterações brandas caracterizadas pela degeneração das células musculares a partir dos cinco minutos de isquemia.

A serosa apresentou um leve edema a partir do segundo momento de colheita e nas amostras seguintes.

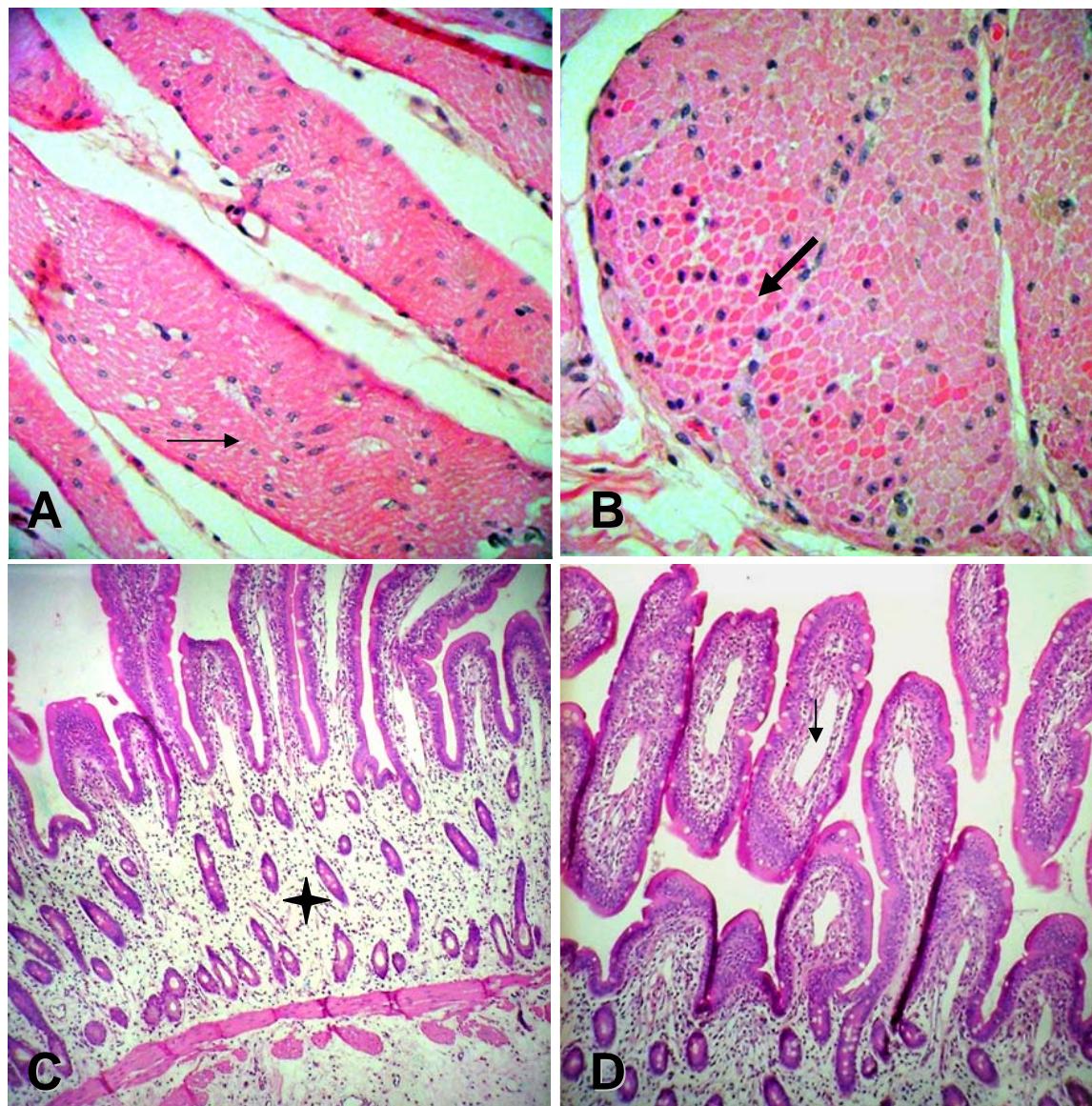


FIGURA 6- Segmentos isolados de jejunum de eqüinos corados por HE. (A) Camada muscular circular (seta) do animal “C” apresentando perda da conexão entre as células e degeneração celular após duas horas de reperfusão (400x). (B) A mesma camada muscular no animal “B” após uma hora de reperfusão contendo células degenerativas com citoplasma com aspecto hialino e refringente (seta larga) (400x). (C) Animal “F” no momento cinco apresentando edema intenso na região da base das criptas (estrela) (400x). (D) O mesmo animal apresentando edema intenso na lâmina própria (seta curta) (400x).

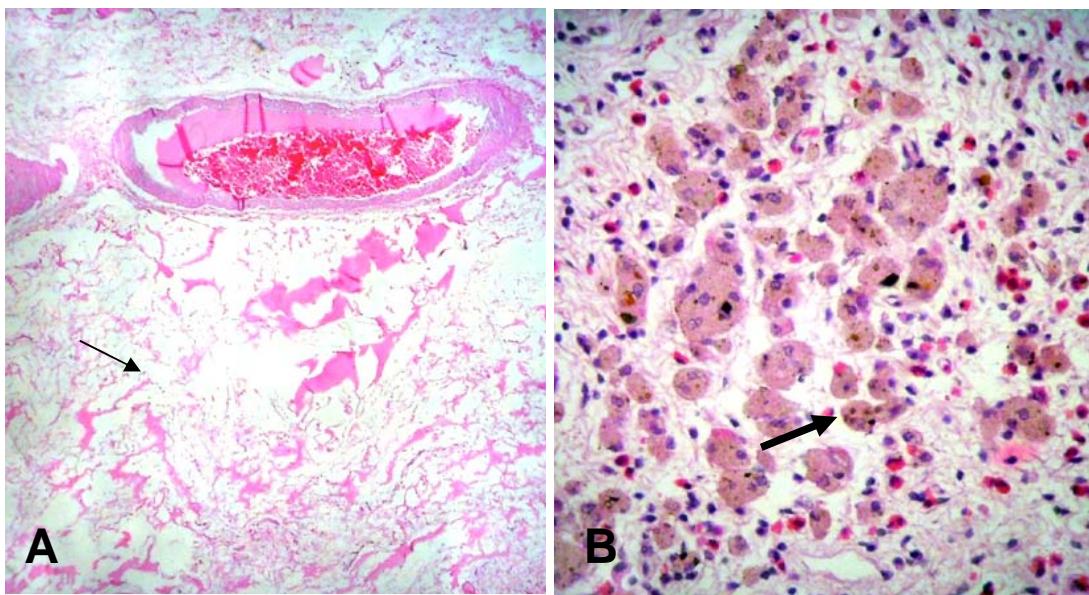


FIGURA 7- Segmentos isolados de jejunum de eqüinos corados por HE. (A) Edema intenso na submucosa (seta) do animal “C” após duas horas de reperfusão (100x). (B) Submucosa do animal “A” após cinco minutos de isquemia apresentando macrófagos contendo hemossiderina (seta larga) (400x).

### 5.3 Estudo imunoistoquímico com anticorpo policlonal anti-phospho p44/42 (ERK 1/2)

As mesmas camadas histológicas anteriormente descritas foram avaliadas. As células da camada muscular da mucosa mostraram marcação discreta no núcleo e citoplasma em todos os momentos (Figura 8). Os enterócitos da mucosa compreenderam o único tipo celular que apresentou marcação de intensidades variadas tanto nos cortes positivos como nos negativos (Figura 9). As demais células em todas as camadas mostraram ausência total de marcação nos cortes negativos. A submucosa exibiu uma predominância de marcação dos núcleos moderada com uma leve diminuição na terceira amostra colhida. Já no citoplasma não houve marcação significativa.

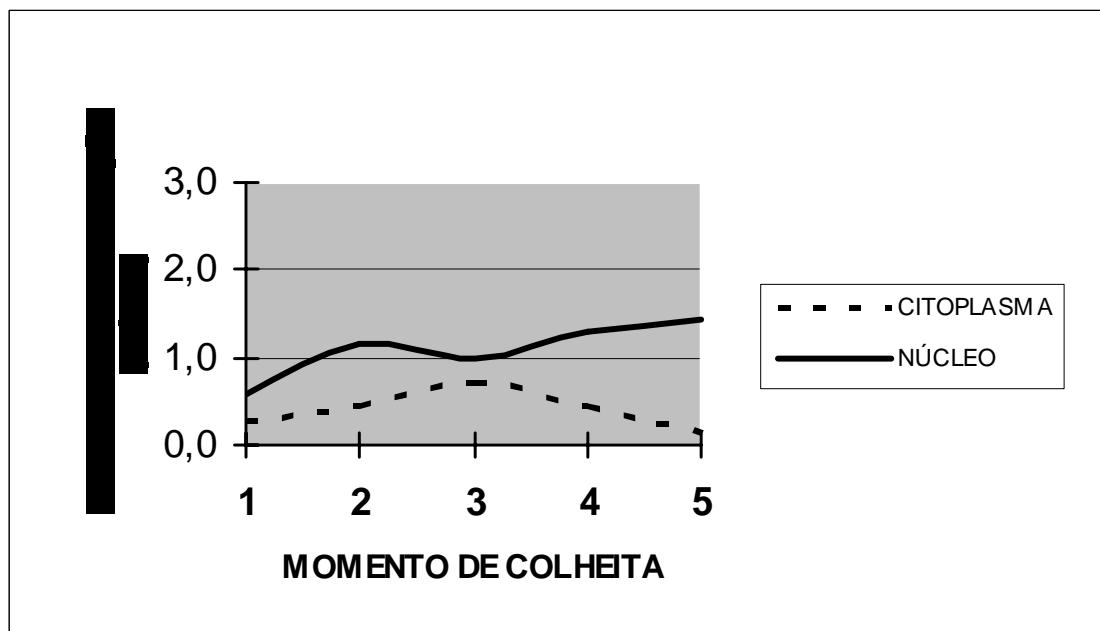


FIGURA 8- Intensidade média de ativação das células da camada muscular da mucosa do jejunum de eqüinos marcadas pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos diferentes momentos de colheita.

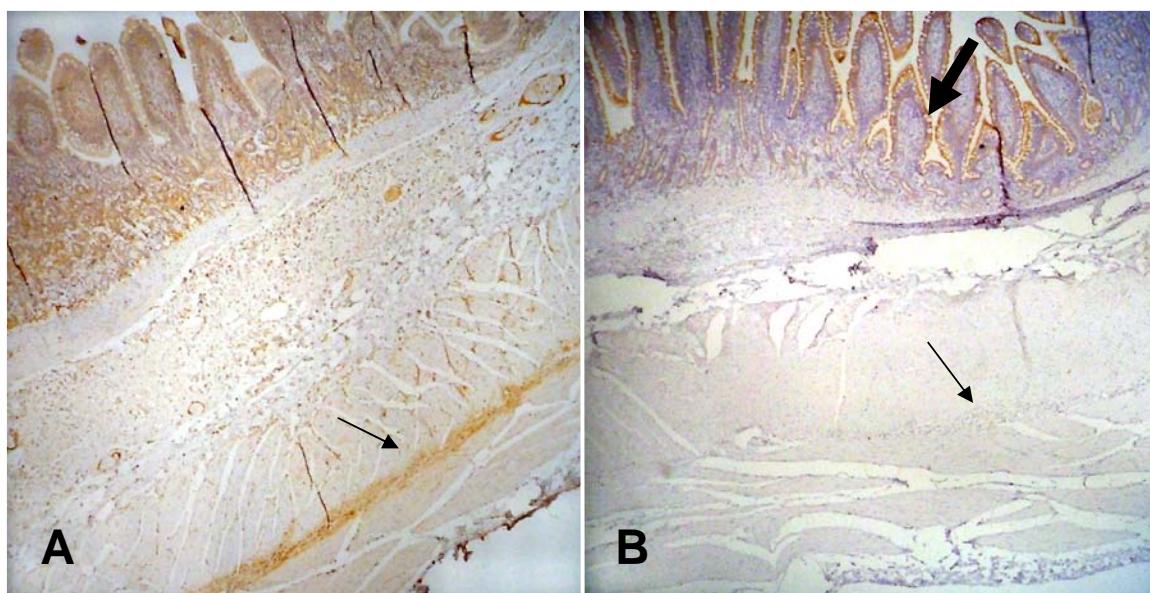


FIGURA 9- Fotomicrografia de fragmentos de jejunum de eqüinos. (A) Corte positivo do animal "E" no momento dois, mostrando o plexo mioentérico (seta) marcado pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 (40x). (B) Corte negativo do animal "G" no momento um, mostrando a ausência de marcação no plexo mioentérico (seta) e a marcação inespecífica do epitélio (seta larga) (40x).

A camada muscular circular mostrou marcação citoplasmática leve com o nível mais baixo verificado na amostra de número quatro, seguido de um aumento discreto tendendo a moderado na amostra cinco. Nesta mesma camada a marcação do núcleo obedeceu a um padrão progressivo que inicialmente (amostra um) foi considerado leve (valor 1,4), manteve-se próximo moderado (1,9) até o momento quatro, quando voltou a progredir atingindo um valor de atribuição de 2,3 após duas horas de reperfusão do segmento (Figura 10). A muscular longitudinal apresentou níveis maiores e mais representativos de marcação (Figura 11). Houve diferença significativa ( $P<0,05$ ) entre os momentos de colheita na camada muscular longitudinal, tanto para núcleo como citoplasma, que seguiram um padrão semelhante de intensidade de marcação, sendo visível a presença de um ponto máximo (pico) quando a marcação atingiu o nível de intensidade três (Figura 12 ).

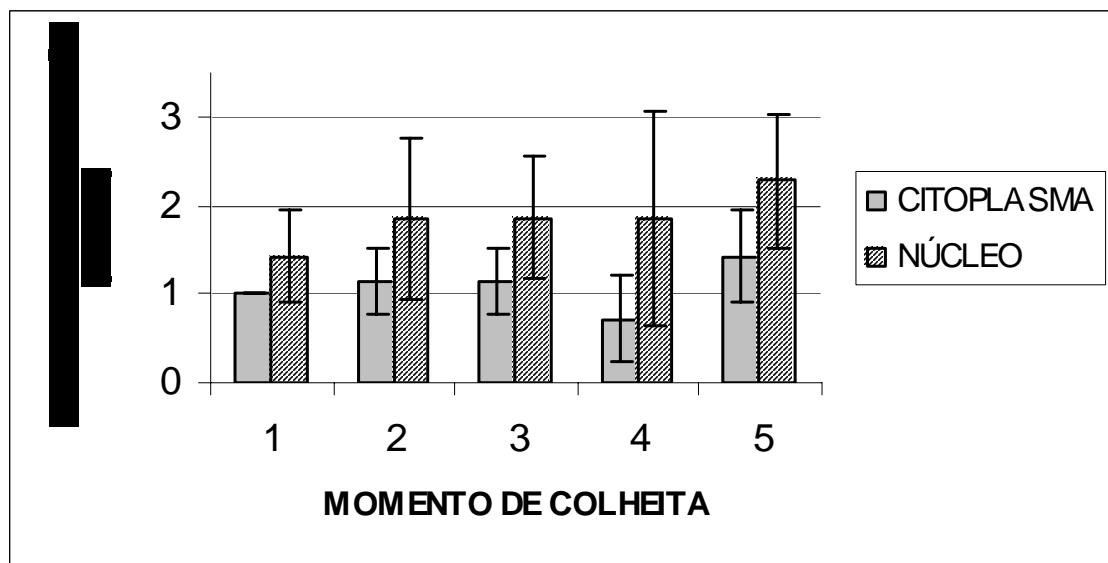


FIGURA 10-Intensidade média de ativação das células da camada muscular circular do jejunum de eqüinos marcadas pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos diferentes momentos de colheita.

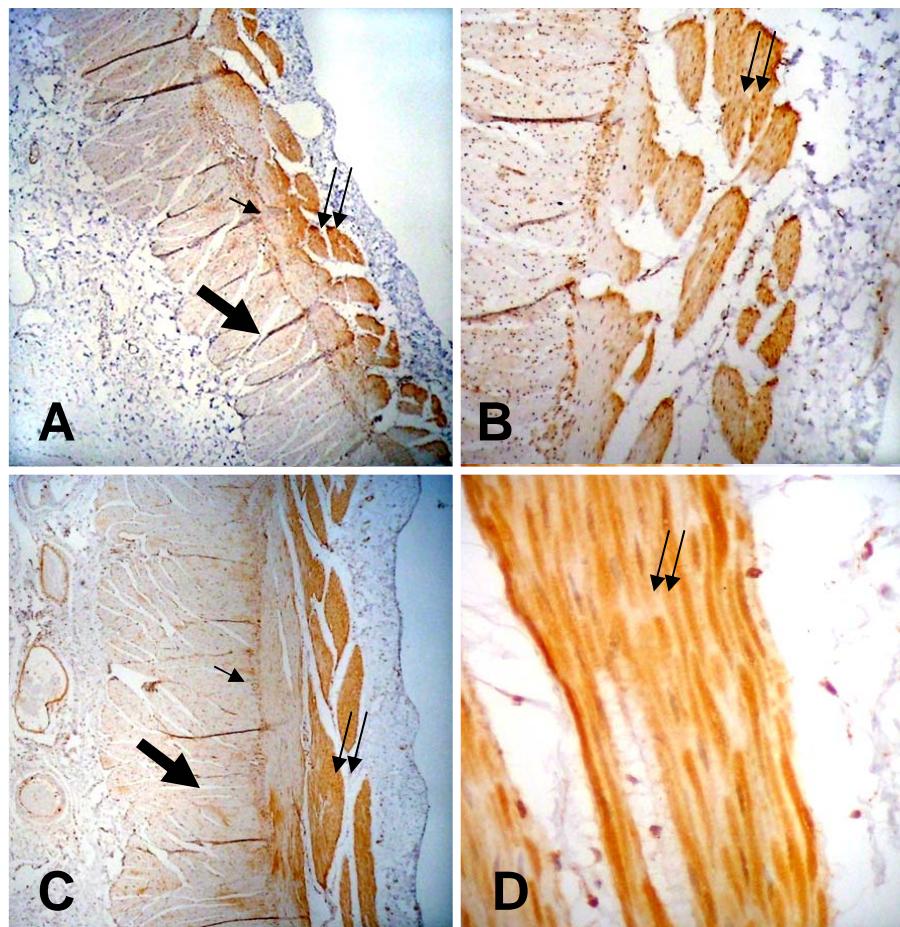


FIGURA 11- Fotomicrografia de camadas musculares de jejuno de equinos marcadas pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42. (A) Animal “D” aos cinco minutos de reperfusão (40 X) e em (B) no pico de ativação de ERK (100 X); (C) e (D) animal “C” no momento três apresentando os mesmos níveis de marcação que o animal “D” (40X e 400X, respectivamente). Camada muscular interna (seta larga), plexo mioentérico (seta curta), camada muscular externa apresentando escore três de ativação (seta dupla).

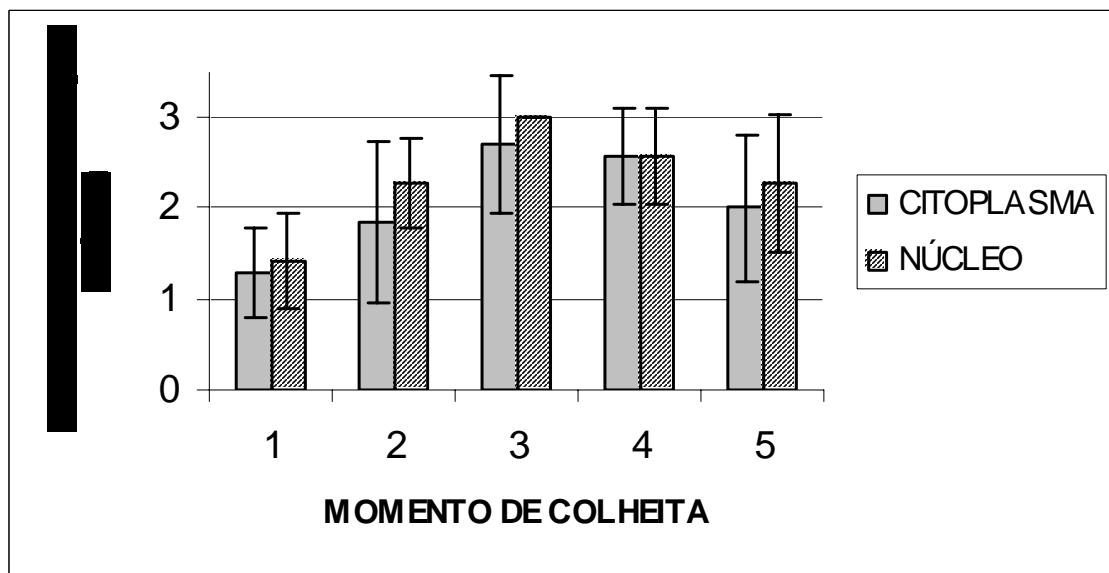


FIGURA 12- Intensidade média de ativação das células da camada muscular longitudinal do jejunum de eqüinos marcadas pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos diferentes momentos de colheita.

As células do plexo mioentérico exibiram marcação moderada tendendo a intensa tanto no citoplasma como no núcleo (Figuras 9A e 13). O endotélio vascular apresentou marcação citoplasmática e nuclear acentuada em 33 dos 35 os cortes positivos (Figura 14).

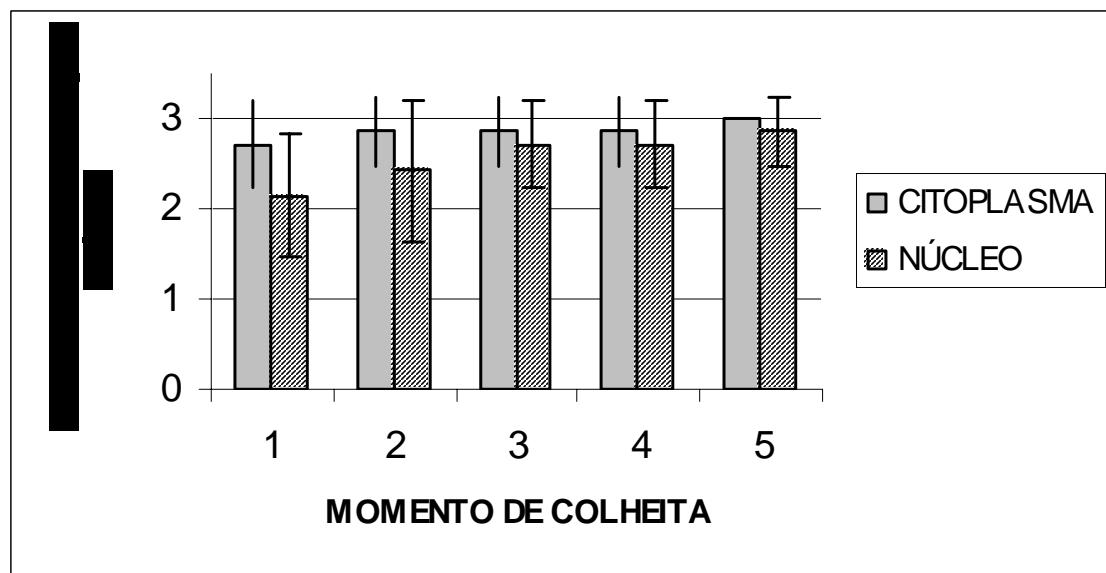


FIGURA 13- Intensidade média de ativação das células do plexo mioentérico do jejunum de eqüinos marcadas pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos diferentes momentos de colheita.

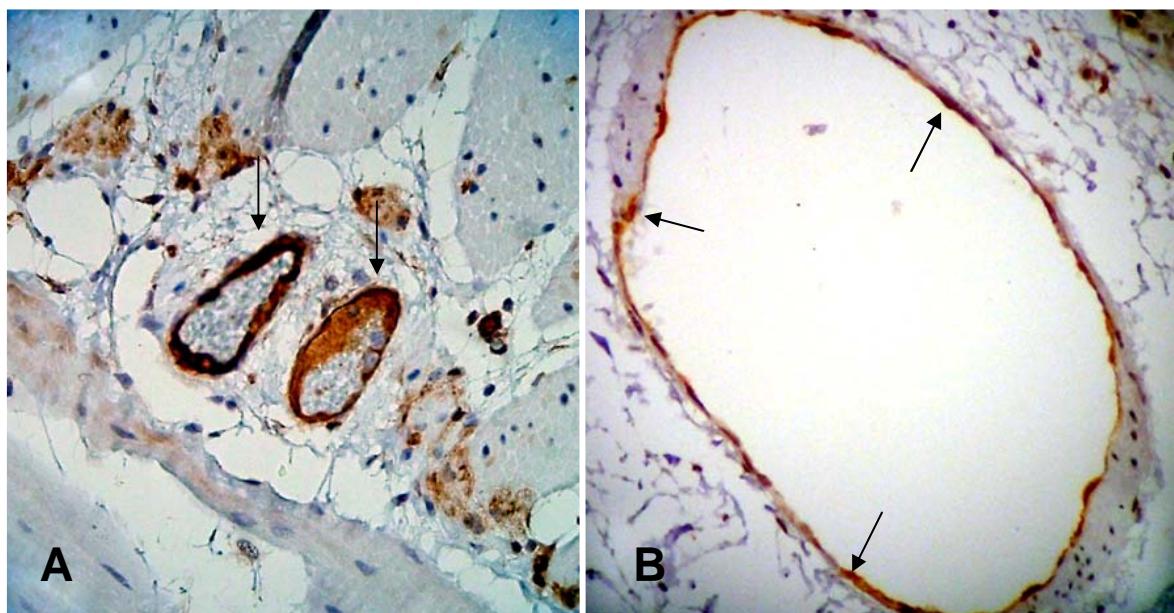


FIGURA 14- Fotomicrografia de fragmentos de jejuno de eqüinos mostrando o endotélio vascular marcado pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 (seta) (A) animal “C” aos cinco minutos de isquemia (400x) e (B) animal “E” após duas horas de reperfusão (400x).

## 6 DISCUSSÃO

A técnica cirúrgica utilizada foi delineada a partir de experimentos prévios (ALVES et al., 2003; SULLINS et al., 1985) e permitiu o aparecimento rápido de alterações macroscópicas do segmento isquêmico. O desenvolvimento de aspecto cianótico com áreas pálidas da serosa isquêmica é esperado e condiz com os achados intra-operatórios das laparotomias exploratórias realizadas nos casos de abdome agudo, que cursam com obstrução do fluxo sanguíneo artério-venoso (ALLEN & TYLER, 1990). O rápido retorno à coloração normal, quando a circulação é restabelecida em casos experimentais, também ocorre em casos de correções cirúrgicas de animais acometidos por patologias obstrutivas do intestino delgado que cursam com oclusão artério-venosa (BLIKSLAGER, 2003), podendo variar de acordo com a duração da obstrução dos vasos.

O aspecto brilhante da serosa é mais um indício da presença de edema. O espessamento visível da parede intestinal observado em seis animais, a partir do final do processo isquêmico, foi semelhante ao encontrado tanto em estudos experimentais (DABAREINER et al., 1993), como em casos naturalmente adquiridos de obstrução estrangulante do intestino de eqüinos (MESCHTER et al., 1986).

As alterações morfológicas da mucosa intestinal, neste caso, foram mínimas. Não houve desprendimento das células do epitélio após uma hora de isquemia ou duas horas de reperfusão. Esses resultados foram semelhantes aos encontrados por DABAREINER et al. (1995). No entanto, outras pesquisas mostraram a ocorrência de separação do epitélio do topo das vilosidades após uma hora de isquemia (CAMPBELL & BLIKSLAGER, 2000; DABAREINER et al., 1993; SULLINS et al., 1985). De acordo com WHITE et al. (1980), um possível mecanismo para a perda das células epiteliais do topo das vilosidades seria o de um acúmulo de líquido no espaço intracelular epitelial, o que levaria a um aumento de pressão e consequente separação mecânica entre as células epiteliais e a lâmina própria, antes mesmo de ocorrer um dano epitelial severo.

O epitélio intestinal está entre os tecidos com capacidade de proliferação mais rápida conhecidos. As células epiteliais intestinais se proliferam rapidamente para preservar o equilíbrio com a perda contínua das mesmas, que

ocorre, como resultado de um mecanismo fisiológico (PODOLSKY, 1993). O papel da ativação de ERK na proliferação do epitélio intestinal ainda não foi elucidado. Um estudo realizado em 2003 sugere que parece não haver uma correlação entre as atividades de ERK e a proliferação do epitélio intestinal (SHENG et al., 2003), o que contradiz os resultados obtidos anteriormente em outro trabalho, onde a ativação de ERK 1/2 resultou em proliferação das células intestinais (ALIAGA et al., 1999). A presença de níveis constitutivos da forma ativada de ERK 1/2 no epitélio não pôde ser demonstrada neste experimento, devido à marcação inespecífica dos enterócitos na mucosa dos cortes negativos (dados não mostrados). No intestino de ratos, as formas fosforiladas de p44/42 estão localizadas principalmente no núcleo de células das criptas e citoplasma e núcleo nos enterócitos das vilosidades (FU et al., 2003). No referido estudo, os cortes foram incubados por um período de apenas 40 minutos utilizando anticorpos primários monoclonais. É possível que o tempo de incubação no anticorpo primário de aproximadamente 16 horas do presente experimento, além do fato de terem sido utilizados anticorpos policlonais desenvolvidos em coelhos, possam ter contribuído para a marcação inespecífica dos enterócitos.

O edema na base da mucosa e submucosa observado neste trabalho foi também um achado esperado, já que o primeiro sinal de lesão de mucosa diante de um quadro de isquemia é o aumento da permeabilidade capilar (HAGLUND, 1994). De acordo com WILLIAMS et al. (1999), a reperfusão do segmento intestinal após isquemia, resulta em lesão das células endoteliais caracterizada por um aumento da permeabilidade vascular e formação de edema.

A presença de intenso infiltrado eosinofílico na submucosa e base da mucosa em modelos experimentais e grupos controle foi descrita por SULLINS et al. (1985). Um grande número de eosinófilos na mucosa e submucosa deveria ser esperado em casos de parasitismo intestinal; entretanto, outros autores relataram altas concentrações dessas células mesmo com a ausência de parasitismo aparente (MESCHTER et al., 1986).

A presença de quantidade moderada de macrófagos contendo hemossiderina na submucosa pode indicar a ocorrência de dano capilar com microhemorragias. Entretanto, depósitos de hemossiderina também foram observados em animais sem histórico de patologia intestinal prévia, presentes

principalmente no topo das vilosidades (OCHOA et al., 1983). Os depósitos de hemossiderina, neste caso, estavam acompanhados de hemorragia intensa em um dos animais, o que torna, portanto, possível a relação deste achado com as lesões capilares acima descritas.

A capacidade da musculatura lisa do intestino em “tolerar” hipóxia é considerada responsável por uma resposta clínica rápida e favorável após obstrução estrangulante experimental em eqüinos (FREEMAN et al., 1988). Contudo, as alterações microscópicas nas camadas musculares do jejuno em geral são raramente descritas. Um estudo mostrou alterações mínimas dessas camadas em eqüinos acometidos por abdome agudo severo, onde os pacientes foram submetidos à cirurgia e/ou eutanásia (MESCHTER et al., 1986). Os resultados do presente experimento mostraram a ocorrência de alterações progressivas mais intensas na camada muscular circular e mais brandas na camada muscular longitudinal, ambas atingindo o maior grau de lesão aos 120 minutos de reperfusão. Estes dados demonstram a necessidade do desenvolvimento de novas pesquisas, para que haja um maior entendimento das lesões provocadas pela isquemia seguida de reperfusão, nas camadas musculares lisas do jejuno.

Os níveis de ativação de ERK 1/2 nas células da camada muscular circular não atingiram um pico, embora nos núcleos os valores tenham se elevado progressivamente, atingindo um escore máximo de 2,3. O citoplasma mostrou oscilação nas atividades de ERK, sendo o escore mínimo encontrado após uma hora de reperfusão.

As atividades de ERK 1/2 nas diferentes camadas do intestino delgado de eqüinos, apresentadas por este experimento, demonstram a existência de oscilação da fosforilação de ERK em resposta aos estímulos provocados pela isquemia e reperfusão. Oscilações semelhantes foram descritas em um estudo realizado em suínos submetidos à circulação extra-corpórea (ARAUJO et al., 2001).

A camada muscular externa apresentou níveis constitutivos de ativação de ERK atingindo um pico, onde ocorreu a ativação máxima da enzima aos cinco minutos de reperfusão. A atividade de ERK foi previamente modulada em células endoteliais, em um estudo que mostrou que após 30 minutos de isquemia houve

um aumento da fosforilação (ativação) de ERK em 2,5 vezes (em relação aos níveis basais) e após duas horas de reperfusão, o aumento observado foi de três vezes (WACHTEL et al., 2002). O presente estudo é o primeiro que delineou esta atividade no intestino delgado eqüinos. Neste caso, foi observado na camada muscular externa um aumento de duas vezes na ativação de ERK aos cinco minutos de isquemia, três vezes desde os cinco até os 60 minutos reperfusão, retornando às duas vezes aos 120 minutos de reperfusão (Figura 11). Comparando-se as alterações microscópicas da camada muscular circular às da muscular longitudinal e paralelamente aos níveis atingidos de ERK ativada em ambas as camadas, é possível estabelecer uma relação de proporção direta entre o aumento da atividade de ERK e a diminuição das lesões significativas nas camadas musculares do jejuno de eqüinos.

Existem evidências de que o sistema nervoso entérico esteja envolvido no processo inflamatório intestinal (XIA et al., 1999). A ativação de ERK 1/2 parece ter um efeito neuroprotetor, além de mediar os efeitos de inúmeros sinais extrínsecos de sobrevivência de células nervosas. Além disso, a fosforilação de ERK em células nervosas parece auxiliar na redução dos efeitos deletérios resultantes de agressões diversas (HETMAN & GOZDZ, 2004). Neste estudo, as células do plexo mioentérico apresentaram níveis basais de ativação de ERK elevados, os quais atingiram os valores máximos aos cinco minutos de isquemia, permanecendo assim até a colheita da quinta amostra (Figura 12). É possível que a ação neuroprotetora atribuída à ERK, associada aos elevados níveis encontrados da forma ativada dessa enzima, tenham relação com a ausência de alterações histológicas observadas no plexo mioentérico.

A intensa marcação das células do endotélio dos vasos pode estar relacionada à capacidade dessas células de secretar um grande número de fatores angiogênicos e de crescimento (LIU et al., 2001). A observação de ativação constitutiva de ERK 1/2 nos cortes de jejuno de eqüinos pode estar relacionada com o papel secretório das células endoteliais, ativas mesmo antes de iniciados os períodos de isquemia e reperfusão.

Algumas citocinas parecem ter participação nas atividades de ERK. Os níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  e da citocina anti-inflamatória IL-10 estão significativamente elevados nos tecidos após isquemia e

reperfusão severas (SOUZA et al., 2000). Estudos realizados *in vitro* em tecidos de ratos mostraram que elementos da muscular longitudinal e plexo mioentérico secretam as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (KHAN & COLLINS, 1994). TNF- $\alpha$  tem um papel importante na formação de lesão de tecidos durante a reperfusão (WELBORN et al., 1996). De acordo com (ARAUJO et al., 2001), TNF- $\alpha$  parece ser parcialmente responsável pelos picos de ativação de MEK/ERK em suínos submetidos à circulação extra-corpórea. IL-6 é eficaz na proteção do intestino, reduzindo a resposta inflamatória aguda nos casos de I/R (KIMIZUKA et al., 2004). Outros autores sugerem que a atividade de ERK 1/2 é necessária para a produção de IL-6 (HAYASHI et al., 2000).

A interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) induz a secreção de interleucina-8 (IL-8) em células nervosas por um mecanismo dependente da via de transdução de sinal intracelular de ERK 1/2 e p38, ou seja, há evidências do envolvimento de ERK 1/2 na secreção de IL-8 (TIXIER et al., 2005). IL-8 é uma das importantes citocinas responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos ou linfócitos T para o local da inflamação (BAGGIOLINI et al., 1989) e é capaz de estimular a migração e crescimento de células epiteliais, processo que pode estar relacionado à reparação da mucosa (WILSON et al., 1999). Outro aspecto relevante é a atividade de IL-1 $\beta$  como indutor da interleucina-10 (IL-10) durante isquemia e reperfusão intestinal severas. IL-10 produz uma ação antiinflamatória durante o processo de reperfusão (LANE et al., 1997) e está associada a uma diminuição da concentração de TNF- $\alpha$  e consequentemente da lesão tecidual (SOUZA et al., 2003). De acordo com os resultados encontrados, é possível admitir que o envolvimento de mediadores químicos da inflamação nos casos de isquemia e reperfusão intestinal possam ter relação com as propriedades anti-apoptóticas de ERK 1/2.

Outros mediadores químicos da inflamação estão envolvidos nas atividades de ERK 1/2 nos quadros de I/R intestinal. O fator de crescimento fibroblástico básico, por exemplo, quando administrado em ratos, aumenta a expressão das formas fosforiladas de p44/42 (FU et al., 2003). A realização de novos experimentos possivelmente facilitará o entendimento do complexo de mediadores e estímulos envolvidos nas atividades de ERK.

Ao longo do tempo, várias tentativas de evitar os efeitos deletérios da I/R no intestino de eqüinos foram feitas. No entanto, as situações clínicas de abdome agudo que cursam com a interrupção do fluxo sanguíneo intestinal ainda resultam em índices drásticos de fatalidade, mesmo quando a reparação cirúrgica bem como o emprego de tratamentos modernos é realizada. Diversas pesquisas mostraram o benefício que algumas drogas podem representar nestes casos, mas nenhum tratamento isolado parece ter a eficácia necessária. Os mecanismos envolvidos na transdução de sinal da proteína quinase ERK 1/2 podem representar um caminho promissor na descoberta de novos protocolos de tratamento, além de uma compreensão mais ampla do processo patológico. Futuros estudos que estabeleçam um paralelo entre os mecanismos envolvidos na transdução de sinal da proteína ERK 1/2 e a atuação de complexos farmacológicos serão necessários para estabelecer a viabilidade de se potencializar o efeito protetor desta enzima como forma de minimizar os efeitos deletérios da isquemia e reperfusão no intestino de eqüinos.

## 7 CONCLUSÕES

Nas condições de realização do presente experimento, é possível concluir que:

- 1) A utilização do anticorpo primário policlonal anti-phospho-p44/42, na imunoistoquímica de fragmentos de jejuno de eqüinos submetidos à isquemia e reperfusão, demonstra a ativação da quinase ERK 1/2 nos diferentes momentos de coleta e camadas do segmento em estudo;
- 2) Os índices mais expressivos de ERK 1/2 fosforilada foram observados na camada muscular longitudinal. Estes índices apresentaram um padrão progressivo de ativação, atingiram um pico e reduziram gradativamente até o último momento observado de duas horas de reperfusão;
- 3) Nas células da camada muscular longitudinal e do plexo mioentérico, onde foi observada intensa ativação de ERK, foi registrada intensidade mínima de lesões microscópicas.

## REFERÊNCIAS

1. ABE, J.; BAINES, C. P.; BERK, B. C. Role of mitogen-activated protein kinases in ischemia and reperfusion injury: the good and the bad. **Circ Res**, Dallas, v. 86, n. 6, p. 607-609, 2000.
2. ALIAGA, J. C.; DESCHÈNES, C.; BEAULIEU, J.; CALVO, E. L.; RIVARD, N. Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. **American Physiological Society**, Bethesda, v. 277, n. 3, p. G631- G641, 1999.
3. ALLEN, D., JR.; WHITE, N. A., 2ND; TYLER, D. E. Morphologic effects of experimental distention of equine small intestine. **Vet Surg**, Philadelphia, v. 17, n. 1, p. 10-14, 1988.
4. ALLEN, D.; TYLER, D. E. Pathophysiology of acute abdominal disease. In: WHITE, N. A. **The equine acute abdomen**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1990. cap.3, p.65-87.
5. ALVES, G. E. S.; MATOS, J. J. R. T.; FALEIROS, R. R.; SANTOS, R. L.; MARQUES JÚNIOR, A. P. Efeito da hidrocortisona sobre a lesão de reperfusão e reparação da mucosa após isquemia venosa experimental no jejuno de eqüinos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 55, n. 5, p. 2003.
6. ANDREWS, F. J.; MALCONTENTI-WILSON, C.; O'BRIEN, P. E. Protection against gastric ischemia-reperfusion injury by nitric oxide generators. **Dig Dis Sci**, New York, v. 39, n. 2, p. 366-373, 1994.
7. ARAUJO, E. G.; BIANCHI, C.; FARO, R.; SELLKE, F. W. Oscillation in the activities of MEK/ERK1/2 during cardiopulmonary bypass in pigs. **Surgery**, Phoenix, v. 130, n. 2, p. 182-191, 2001.
8. BAGGIOLINI, M.; WALZ, A.; KUNKEL, S. L. Neutrophil-activating peptide-1/interleukin 8, a novel cytokine that activates neutrophils. **J Clin Invest**, Jacksonville, v. 84, n. 4, p. 1045-1049, 1989.
9. BLIKSLAGER, A. T. Treatment of gastrointestinal ischemic injury. **Vet Clin North Am Equine Pract**, Philadelphia, v. 19, n. 3, p. 715-727, 2003.
10. CAMPBELL, N. B.; BLIKSLAGER, A. T. The role of cyclooxygenase inhibitors in repair of ischaemic-injured jejunal mucosa in the horse. **Equine Vet J Suppl**, Ford Ham, n. 32, p. 59-64, 2000.
11. CERQUEIRA, N. F.; YOSHIDA, W. B. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 17, n. 6, p. 417, 2002.
12. CHAN, K. L.; ZHANG, X. H.; FUNG, P. C.; GUO, W. H.; TAM, P. K. Role of nitric oxide in intestinal ischaemia-reperfusion injury studied using electron paramagnetic resonance. **Br J Surg**, Oxford, v. 86, n. 11, p. 1427-1432, 1999.

13. CHANG, T. H.; LIU, X. Y.; ZHANG, X. H.; WANG, H. L. Effects of dl-praeruptorin A on interleukin-6 level and Fas, bax, bcl-2 protein expression in ischemia-reperfusion myocardium. **Acta Pharmacol Sin**, Bethesda, v. 23, n. 9, p. 769-774, 2002.
14. COHEN, M. V. Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: is this the time for clinical trials? **Ann Intern Med**, Philadelphia, v. 111, n. 11, p. 918-931, 1989.
15. CROSS, T. G.; SCHEEL-TOELLNER, D.; HENRIQUEZ, N. V.; DEACON, E.; SALMON, M.; LORD, J. M. Serine/threonine protein kinases and apoptosis. **Exp Cell Res**, San Diego, v. 256, n. 1, p. 34-41, 2000.
16. CUZZOCREA, S.; CHATTERJEE, P. K.; MAZZON, E.; DUGO, L.; DE SARRO, A.; VAN DE LOO, F. A.; CAPUTI, A. P.; THIEMERMANN, C. Role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after postischemic injury. **Shock**, Agusta, v. 18, n. 2, p. 169-176, 2002.
17. DABAREINER, R. M.; SNYDER, J. R.; SULLINS, K. E.; WHITE, N. A., 2ND; GARDNER, I. A. Evaluation of the microcirculation of the equine jejunum and ascending colon after ischemia and reperfusion. **Am J Vet Res**, Chicago, v. 54, n. 10, p. 1683-1692, 1993.
18. DABAREINER, R. M.; SNYDER, J. R.; WHITE, N. A.; PASCOE, J. R.; HARMON, F. A.; GARDNER, I.; WOLINER, M. J.; PINNEY, D.; SULLINS, K. E. Microvascular permeability and endothelial cell morphology associated with low-flow ischemia/reperfusion injury in the equine jejunum. **Am J Vet Res**, Chicago, v. 56, n. 5, p. 639-648, 1995.
19. DART, A. J.; SNYDER, J. R.; JULIAN, D.; HINDS, D. M. Microvascular circulation of the small intestine in horses. **Am J Vet Res**, Chicago, v. 53, n. 6, p. 995-1000, 1992.
20. DORAN, R.; ALLEN, D.; ORSINI, J. A. Small intestine. In: AUER, J. A. **Equine Surgery**. 1.ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992. cap.35, p.360-378.
21. DUNIN, CH.; SOUZA, M.F.A. Código de ética no uso científico de animais. Rio de Janeiro: Sociedade Zoófila Educativa. [s.p.], 1996.
22. ERNSTER, L. Biochemistry of reoxygenation injury. **Crit Care Med**, Baltimore, v. 16, n. 10, p. 947-953, 1988.
23. FLAHERTY, J. T.; WEISFELDT, M. L. Reperfusion injury. **Free Radic Biol Med**, Elmsford, v. 5, n. 5-6, p. 409-419, 1988.
24. FREEMAN, D. E.; CIMPRICH, R. E.; RICHARDSON, D. W.; GENTILE, D. G.; ORSINI, J. A.; TULLENERS, E. P.; FETROW, J. P. Early mucosal healing and chronic changes in pony jejunum after various types of strangulation obstruction. **Am J Vet Res**, Chicago, v. 49, n. 6, p. 810-818, 1988.

25. FU, X.; SHENG, Z.; WANG, Y.; YE, Y.; XU, M.; SUN, T.; ZHOU, B. Basic fibroblast growth factor reduces the gut and liver morphologic and functional injuries after ischemia and reperfusion. **J Trauma**, Baltimore, v. 42, n. 6, p. 1080-1085, 1997.
26. FU, X. B.; YANG, Y. H.; SUN, T. Z.; CHEN, W.; LI, J. Y.; SHENG, Z. Y. Rapid mitogen-activated protein kinase by basic fibroblast growth factor in rat intestine after ischemia/reperfusion injury. **World J Gastroenterol**, Beijing, v. 9, n. 6, p. 1312-1317, 2003.
27. GERARD, M. P.; BLIKSLAGER, A. T.; ROBERTS, M. C.; TATE, L. P., JR.; ARGENZIO, R. A. The characteristics of intestinal injury peripheral to strangulating obstruction lesions in the equine small intestine. **Equine Vet J**, Fordham, v. 31, n. 4, p. 331-335, 1999.
28. GRANGER, D. N.; MCCORD, J. M.; PARKS, D. A.; HOLLWARTH, M. E. Xanthine oxidase inhibitors attenuate ischemia-induced vascular permeability changes in the cat intestine. **Gastroenterology**, New York, v. 90, n. 1, p. 80-84, 1986.
29. GREEN, D. R.; REED, J. C. Mitochondria and apoptosis. **Science**, Stanford, v. 281, n. 5381, p. 1309-1312, 1998.
30. GRISHAM, M. B.; HERNANDEZ, L. A.; GRANGER, D. N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. **Am J Physiol**, Bethesda, v. 251, n. 4 Pt 1, p. G567-574, 1986.
31. GOLDENBERG, S. Aspectos éticos da pesquisa com animais. **Acta Cirúrgica Brasileira**, [online], São Paulo, v. 15, n. 4, 2000. Disponível em <http://www.scielo.br>. Acesso em: 23 mai. 2004.
32. GUERRA, P., Eqüinos: Brasil possui terceiro maior rebanho mundial de cavalos. **Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil**. [online], 2003. Disponível em: <http://www.cna.org.br/cna/index.wsp>. Acesso em: 24/08/2004.
33. HAGLUND, U. Gut ischaemia. **Gut**, London, v. 35, n. 1 Suppl, p. S73-76, 1994.
34. HAY, W. P.; MUELLER, P. O. E. Congenital and familial diseases. In: MOORE, J. N. **Equine medicine and surgery**. St. Louis: Mosby, 1999a. cap.10, p.717-718.
35. HAY, W. P.; MUELLER, P. O. E. Small intestinal obstruction. In: MOORE, J. N. **Equine medicine and surgery**. 5.ed. St. Louis: Mosby, 1999b. cap.10, p.716.
36. HAYASHI, R.; YAMASHITA, N.; MATSUI, S.; FUJITA, T.; ARAYA, J.; SASSA, K.; ARAI, N.; YOSHIDA, Y.; KASHII, T.; MARUYAMA, M.; SUGIYAMA, E.; KOBAYASHI, M. Bradykinin stimulates IL-6 and IL-8 production by human lung

- fibroblasts through ERK- and p38 MAPK-dependent mechanisms. **Eur Respir J**, Copenhagen, v. 16, n. 3, p. 452-458, 2000.
37. HETMAN, M.; GOZDZ, A. Role of extracellular signal regulated kinases 1 and 2 in neuronal survival. **Eur J Biochem**, Oxford, v. 271, n. 11, p. 2050-2055, 2004.
38. ITO, T.; DENG, X.; CARR, B.; MAY, W. S. Bcl-2 phosphorylation required for anti-apoptosis function. **J Biol Chem**, Bethesda, v. 272, n. 18, p. 11671-11673, 1997.
39. JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science**, Stanford, v. 298, n. 5600, p. 1911-1912, 2002.
40. JONES, T. C. Introduction: cell death and tissues. In: WILKINS, W. A. **Veterinary Pathology**. 6th.ed. Baltimore: 1997. cap.1, p.11-13.
41. KHAN, I.; COLLINS, S. M. Expression of cytokines in the longitudinal muscle myenteric plexus of the inflamed intestine of rat. **Gastroenterology**, New York, v. 107, n. 3, p. 691-700, 1994.
42. KIMIZUKA, K.; NAKAO, A.; NALESNIK, M. A.; DEMETRIS, A. J.; UCHIYAMA, T.; RUPPERT, K.; FINK, M. P.; STOLZ, D. B.; MURASE, N. Exogenous IL-6 inhibits acute inflammatory responses and prevents ischemia/reperfusion injury after intestinal transplantation. **Am J Transplant**, Malden, v. 4, n. 4, p. 482-494, 2004.
43. KLEBANOFF, S. S. Products of oxygen metabolism. In: J. I. GALLIN, I. M. G. A. R. S. **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. New York: Raven Press, 1988. cap.21, p.391-444.
44. KUBES, P.; HUNTER, J.; GRANGER, D. N. Ischemia/reperfusion-induced feline intestinal dysfunction: importance of granulocyte recruitment. **Gastroenterology**, New York, v. 103, n. 3, p. 807-812, 1992.
45. KUROSE, I.; WOLF, R.; GRISHAM, M. B.; GRANGER, D. N. Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. **Circ Res**, Dallas, v. 74, n. 3, p. 376-382, 1994.
46. KURTEL, H.; FUJIMOTO, K.; ZIMMERMAN, B. J.; GRANGER, D. N.; TSO, P. Ischemia-reperfusion-induced mucosal dysfunction: role of neutrophils. **Am J Physiol**, Bethesda, v. 261, n. 3 Pt 1, p. G490-496, 1991.
47. KYRIAKIS, J. M.; APP, H.; ZHANG, X. F.; BANERJEE, P.; BRAUTIGAN, D. L.; RAPP, U. R.; AVRUCH, J. Raf-1 activates MAP kinase-kinase. **Nature**, New York, v. 358, n. 6385, p. 417-421, 1992.
48. LANE, J. S.; TODD, K. E.; LEWIS, M. P.; GLOOR, B.; ASHLEY, S. W.; REBER, H. A.; MCFADDEN, D. W.; CHANDLER, C. F. Interleukin-10 reduces the

- systemic inflammatory response in a murine model of intestinal ischemia/reperfusion. **Surgery**, Phoenix, v. 122, n. 2, p. 288-294, 1997.
49. LIU, S.; YU, D.; XU, Z. P.; RIORDAN, J. F.; HU, G. F. Angiogenin activates Erk1/2 in human umbilical vein endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v. 287, n. 1, p. 305-310, 2001.
50. MAIR, T. S.; EDWARDS, G. B. Strangulating obstructions of the small intestine. **Equine Vet Educ**, New Market, v. 15, n. 4, p. 192-199, 2003.
51. MANSOUR, S. J.; MATTEN, W. T.; HERMANN, A. S.; CANDIA, J. M.; RONG, S.; FUKASAWA, K.; VANDE WOUDE, G. F.; AHN, N. G. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. **Science**, Stanford, v. 265, n. 5174, p. 966-970, 1994.
52. MARTIN, M. T.; SCRUTCHFIELD, W. L.; JOYCE, J. R. A systematic approach to estimating the age of a horse. **AAEP Proceedings**, Lexington, v. 45, p. 273-275, 1999.
53. MASSBERG, S.; ENDERS, G.; LEIDERER, R.; EISENMENGER, S.; VESTWEBER, D.; KROMBACH, F.; MESSMER, K. Platelet-endothelial cell interactions during ischemia/reperfusion: the role of P-selectin. **Blood**, Stanford, v. 92, n. 2, p. 507-515, 1998.
54. MESCHTER, C. L.; TYLER, D. E.; WHITE, N. A.; MOORE, J. Histologic findings in the gastrointestinal tract of horses with colic. **Am J Vet Res**, Chicago, v. 47, n. 3, p. 598-606, 1986.
55. MONTALTO, M. C.; HART, M. L.; JORDAN, J. E.; WADA, K.; STAHL, G. L. Role for complement in mediating intestinal nitric oxide synthase-2 and superoxide dismutase expression. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, Bethesda, v. 285, n. 1, p. G197-206, 2003.
56. MOORE, R. M. Clinical relevance of intestinal reperfusion injury in horses. **J Am Vet Med Assoc**, Ithaca, v. 211, n. 11, p. 1362-1366, 1997.
57. MOORE, R. M.; BERTONE, A. L.; BAILEY, M. Q.; MUIR, W. W.; BEARD, W. L. Neutrophil accumulation in the large colon of horses during low-flow ischemia and reperfusion. **Am J Vet Res**, Chicago, v. 55, n. 10, p. 1454-1463, 1994.
58. MOORE, R. M.; MUIR, W. W.; GRANGER, D. N. Mechanisms of gastrointestinal ischemia-reperfusion injury and potential therapeutic interventions: a review and its implications in the horse. **J Vet Intern Med**, Philadelphia, v. 9, n. 3, p. 115-132, 1995.
59. MORIYAMA, M.; YAMOCHI, T.; SEMBA, K.; AKIYAMA, T.; MORI, S. BCL-6 is phosphorylated at multiple sites in its serine- and proline-clustered region by mitogen-activated protein kinase (MAPK) in vivo. **Oncogene**, New York, v. 14, n. 20, p. 2465-2474, 1997.

60. NODA, T.; IWAKIRI, R.; FUJIMOTO, K.; MATSUO, S.; AW, T. Y. Programmed cell death induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa. **Am J Physiol**, Bethesda, v. 274, n. 2 Pt 1, p. G270-276, 1998.
61. OCHOA, R.; KOLAJA, G. J.; KLEI, T. R. Hemosiderin deposits in the equine small intestine. **Vet Pathol**, Amsterdam, v. 20, n. 5, p. 641-643, 1983.
62. PARKS, D. A.; GROGAARD, B.; GRANGER, D. N. Comparison of partial and complete arterial occlusion models for studying intestinal ischemia. **Surgery**, Phoenix, v. 92, n. 5, p. 896-901, 1982.
63. PEARSON, G.; ROBINSON, F.; BEERS GIBSON, T.; XU, B. E.; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M. H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. **Endocr Rev**, Bethesda, v. 22, n. 2, p. 153-183, 2001.
64. PFEIFFER, C. J.; MACPHERSON, B. R. Anatomy of the gastrointestinal tract and peritoneal cavity. In: WHITE, N. A. **The equine acute abdomen**. Philadelphia: Lea and Febiger, 1990. cap.1, p.2-24.
65. PODOLSKY, D. K. Regulation of intestinal epithelial proliferation: a few answers, many questions. **Am J Physiol**, Bethesda, v. 264, n. 2 Pt 1, p. G179-186, 1993.
66. ROWE, E. L.; WHITE, N. A.; BUECHNER-MAXWELL, V.; ROBERTSON, J. L.; WARD, D. L. Detection of apoptotic cells in intestines from horses with and without gastrointestinal tract disease. **Am J Vet Res**, Chicago, v. 64, n. 8, p. 982-988, 2003.
67. Sampaio, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. Belo Horizonte, FEPMV, 1998. p 221.
68. SEKHON, B.; SEKHON, C.; KHAN, M.; PATEL, S. J.; SINGH, I.; SINGH, A. K. N-Acetyl cysteine protects against injury in a rat model of focal cerebral ischemia. **Brain Res**, Amsterdam, v. 971, n. 1, p. 1-8, 2003.
69. SHAN, R.; PRICE, J. O.; GAARDE, W. A.; MONIA, B. P.; KRANTZ, S. B.; ZHAO, Z. J. Distinct roles of JNKs/p38 MAP kinase and ERKs in apoptosis and survival of HCD-57 cells induced by withdrawal or addition of erythropoietin. **Blood**, Stanford, v. 94, n. 12, p. 4067-4076, 1999.
70. SHENG, H.; SHAO, J.; TOWNSEND, C. M., JR.; EVERS, B. M. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates proliferative signals in intestinal epithelial cells. **Gut**, London, v. 52, n. 10, p. 1472-1478, 2003.
71. SHEPHERD, A. P.; GRANGER, D. N. Metabolic regulation of intestinal circulation. In: GRANGER, D. N. **Physiology of the intestinal circulation**. New York: Raven Press, 2001. cap.2, p.33-47.

72. SNYDER, J. R. The pathophysiology of intestinal damage: effects of luminal distention and ischemia. **Vet Clin North Am Equine Pract**, Philadelphia, v. 5, n. 2, p. 247-270, 1989.
73. SOUZA, D. G.; COUTINHO, S. F.; SILVEIRA, M. R.; CARA, D. C.; TEIXEIRA, M. M. Effects of a BLT receptor antagonist on local and remote reperfusion injuries after transient ischemia of the superior mesenteric artery in rats. **Eur J Pharmacol**, Amsterdam, v. 403, n. 1-2, p. 121-128, 2000.
74. SOUZA, D. G.; GUABIRABA, R.; PINHO, V.; BRISTOW, A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M. IL-1-driven endogenous IL-10 production protects against the systemic and local acute inflammatory response following intestinal reperfusion injury. **J Immunol**, Baltimore, v. 170, n. 9, p. 4759-4766, 2003.
75. SULLINS, K. E.; STASHAK, T. S.; MERO, K. N. Pathologic changes associated with induced small intestinal strangulation obstruction and nonstrangulating infarction in horses. **Am J Vet Res**, Chicago, v. 46, n. 4, p. 913-916, 1985.
76. SUN, Z.; WANG, X.; WALLEN, R.; DENG, X.; DU, X.; HALLBERG, E.; ANDERSSON, R. The influence of apoptosis on intestinal barrier integrity in rats. **Scand J Gastroenterol**, Oslo, v. 33, n. 4, p. 415-422, 1998.
77. TEDDER, T. F.; STEEBER, D. A.; CHEN, A.; ENGEL, P. The selectins: vascular adhesion molecules. **Faseb J**, Bethesda, v. 9, n. 10, p. 866-873, 1995.
78. THORNBERRY, N. A.; LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, Stanford, v. 281, n. 5381, p. 1312-1316, 1998.
79. TIXIER, E.; LALANNE, F.; JUST, I.; GALMICHE, J. P.; NEUNLIST, M. Human mucosa/submucosa interactions during intestinal inflammation: involvement of the enteric nervous system in interleukin-8 secretion. **Cell Microbiol**, Malden, v. 7, n. 12, p. 1798-1810, 2005.
80. TRAUB-DARGATZ, J. L.; KOPRAL, C. A.; SEITZINGER, A. H.; GARBER, L. P.; FORDE, K.; WHITE, N. A. Estimate of the national incidence of and operation-level risk factors for colic among horses in the United States, spring 1998 to spring 1999. **J Am Vet Med Assoc**, Ithaca, v. 219, n. 1, p. 67-71, 2001.
81. WACHTEL, M.; FREI, K.; EHLER, E.; BAUER, C.; GASSMANN, M.; GLOOR, S. M. Extracellular signal-regulated protein kinase activation during reoxygenation is required to restore ischaemia-induced endothelial barrier failure. **Biochem J**, London, v. 367, n. Pt 3, p. 873-879, 2002.
82. WANG, H. G.; RAPP, U. R.; REED, J. C. Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. **Cell**, Philadelphia, v. 87, n. 4, p. 629-638, 1996.
83. WELBORN, M. B., 3RD; DOUGLAS, W. G.; ABOUHAMZE, Z.; AUFFENBURG, T.; ABOUHAMZE, A. S.; BAUMHOFER, J.; SEEGER, J. M.;

- PRUITT, J. H.; EDWARDS, P. D.; CHIZZONITE, R.; MARTIN, D.; MOLDAWER, L. L.; HARWARD, T. R. Visceral ischemia-reperfusion injury promotes tumor necrosis factor (TNF) and interleukin-1 (IL-1) dependent organ injury in the mouse. **Shock**, Augusta, v. 6, n. 3, p. 171-176, 1996.
84. WHITE, N. A., Pathology of the small and large intestine. **IVIS**. [online], 2003. Disponível em: [www.ivis.org](http://www.ivis.org). Acesso em: 10/07/2004.
85. WHITE, N. A. Intestinal infarction associated with mesenteric vascular thrombotic disease in the horse. **J Am Vet Med Assoc**, Ithaca, v. 178, n. 3, p. 259-262, 1981.
86. WHITE, N. A.; MOORE, J. N.; TRIM, C. M. Mucosal alterations in experimentally induced small intestinal strangulation obstruction in ponies. **Am J Vet Res**, Chicago, v. 41, n. 2, p. 193-198, 1980.
87. WHITMARSH, A. J.; DAVIS, R. J., Signal transduction by MAP kinases: regulation by phosphorylation-dependent switches. **stke**. [online], 1999. Disponível em: [http://www.stke.org/cgi/content/full/OC\\_sigtrans;1999/1/pe1](http://www.stke.org/cgi/content/full/OC_sigtrans;1999/1/pe1). Acesso em: 10 jun 2004.
88. WIDMANN, C.; GIBSON, S.; JARPE, M. B.; JOHNSON, G. L. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiol Rev**, Bethesda, v. 79, n. 1, p. 143-180, 1999.
89. WILLIAMS, J. P.; PECHET, T. T.; WEISER, M. R.; REID, R.; KOBZIK, L.; MOORE, F. D., JR.; CARROLL, M. C.; HECHTMAN, H. B. Intestinal reperfusion injury is mediated by IgM and complement. **J Appl Physiol**, Bethesda, v. 86, n. 3, p. 938-942, 1999.
90. WILSON, A. J.; BYRON, K.; GIBSON, P. R. Interleukin-8 stimulates the migration of human colonic epithelial cells in vitro. **Clin Sci**, London, v. 97, n. 3, p. 385-390, 1999.
91. XIA, Y.; HU, H. Z.; LIU, S.; REN, J.; ZAFIROV, D. H.; WOOD, J. D. IL-1 $\beta$  and IL-6 excite neurons and suppress nicotinic and noradrenergic neurotransmission in guinea pig enteric nervous system. **J Clin Invest**, Michigan, v. 103, n. 9, p. 1309-1316, 1999.
92. XIA, Z.; DICKENS, M.; RAINGEAUD, J.; DAVIS, R. J.; GREENBERG, M. E. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. **Science**, Stanford, v. 270, n. 5240, p. 1326-1331, 1995.
93. YUE, T. L.; WANG, C.; GU, J. L.; MA, X. L.; KUMAR, S.; LEE, J. C.; FEUERSTEIN, G. Z.; THOMAS, H.; MALEEFF, B.; OHLSTEIN, E. H. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. **Circ Res**, New York, v. 86, n. 6, p. 692-699, 2000.

94. ZHANG, M.; AUSTEN, W. G., JR.; CHIU, I.; ALICOT, E. M.; HUNG, R.; MA, M.; VERNA, N.; XU, M.; HECHTMAN, H. B.; MOORE, F. D., JR.; CARROLL, M. C. Identification of a specific self-reactive IgM antibody that initiates intestinal ischemia/reperfusion injury. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v. 101, n. 11, p. 3886-3891, 2004.
95. ZIMMERMAN, B. J.; GRANGER, D. N. Reperfusion-induced leukocyte infiltration: role of elastase. **Am J Physiol**, Bethesda, v. 259, n. 2 Pt 2, p. H390-394, 1990.
96. ZIMMERMAN, B. J.; GRISHAM, M. B.; GRANGER, D. N. Role of oxidants in ischemia/reperfusion-induced granulocyte infiltration. **Am J Physiol**, Bethesda, v. 258, n. 2 Pt 1, p. G185-190, 1990.

## ANEXOS

QUADRO 2- Marcação pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos cortes positivos das células de diferentes camadas do jejun no animal “A”, em cinco momentos de coleta diferentes.

CAMADA	REGIÃO DA CÉLULA	ANIMAL “A” MOMENTO (TEMPO)					
		A1	A2	A3	A4	A5	
MUCOSA	ENTERÓCITOS VILOSIDADES	CITOPLASMA	+++	++	+++	++	+
		NÚCLEO	+	+	+	+	+
	LÂMINA PRÓPRIA	CITOPLASMA	+	+	+	+	-
		NÚCLEO	+	+	+	+	+
	CRIPTAS DE LIEBERKUHN	CITOPLASMA	+++	++	+	+	+
		NÚCLEO	+	+	-	+	+
MUSCULAR DA MUCOSA	CITOPLASMA	-	+	-	-	-	
	NÚCLEO	-	-	-	-	-	
SUBMUCOSA	CITOPLASMA	-	-	-	-	-	
	NÚCLEO	+	+	-	+	+	
MUSCULAR CIRCULAR	CITOPLASMA	+	+	+	-	++	
	NÚCLEO	+	+	+	-	++	
PLEXO MIOENTÉRICO	CITOPLASMA	+++	+++	+++	+++	+++	
	NÚCLEO	+++	+++	+++	+++	+++	
MUSCULAR LONGITUDINAL	CITOPLASMA	+	+	+++	+++	++	
	NÚCLEO	+	++	+++	+++	++	
SEROSA	CITOPLASMA	-	-	-	-	-	
	NÚCLEO	+++	+++	++	+++	++	
ENDOTÉLIO VASCULAR	CITOPLASMA	+++	++	+++	+	+++	
	NÚCLEO	+++	+++	+++	++	+++	

QUADRO 3- Marcação pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos cortes positivos das células de diferentes camadas do jejuno no animal “B”, em cinco momentos de coleta diferentes.

CAMADA		REGIÃO DA CÉLULA	ANIMAL “B” MOMENTO (TEMPO)				
			B1	B2	B3	B4	B5
MUCOSA	ENTEROCITOS VILOSIDADES	CITOPLASMA	+	++	+++	+++	+
		NÚCLEO	-	+	+	+	+++
	LÂMINA PRÓPRIA	CITOPLASMA	+	+	+	+	+
		NÚCLEO	-	+	+	+	+
	CRIPTAS DE LIEBERKUHN	CITOPLASMA	+	+	++	++	++
		NÚCLEO	-	+	+	+	+
MUSCULAR DA MUCOSA	CITOPLASMA	-	-	+	-	-	-
	NÚCLEO	-	+	+	+	+	+
SUBMUCOSA	CITOPLASMA	-	-	-	-	-	+
	NÚCLEO	+++	+++	+++	+++	+++	+++
MUSCULAR CIRCULAR	CITOPLASMA	+	++	++	+	+	++
	NÚCLEO	+	+	++	+	+	++
PLEXO MIOENTÉRICO	CITOPLASMA	++	+++	+++	++	++	+++
	NÚCLEO	+	+++	+++	++	++	+++
MUSCULAR LONGITUDINAL	CITOPLASMA	+	+++	+++	++	++	+
	NÚCLEO	+	+++	+++	++	++	++
SEROSA	CITOPLASMA	-	-	-	-	-	-
	NÚCLEO	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ENDOTÉLIO VASCULAR	CITOPLASMA	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	NÚCLEO	++	+++	+++	+++	+++	+++

QUADRO 4- Marcação pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos cortes positivos das células de diferentes camadas do jejuno no animal “C”, em cinco momentos de coleta diferentes.

CAMADA		REGIÃO DA CÉLULA	ANIMAL “C” MOMENTO (TEMPO)				
			C1	C2	C3	C4	C5
MUCOSA	ENTEROCITOS VILOSIDADES	CITOPLASMA	+++	++	+	+	+++
		NÚCLEO	+	+	+++	+++	+
	LÂMINA PRÓPRIA	CITOPLASMA	+	++	+	++	+
		NÚCLEO	-	+	-	+	-
	CRIPTAS DE LIEBERKUHN	CITOPLASMA	++	+	++	++	+
		NÚCLEO	+	+	+	+	-
MUSCULAR DA MUCOSA	CITOPLASMA	-	-	-	-	-	-
	NÚCLEO	+	+	+	+	+	-
SUBMUCOSA	CITOPLASMA	-	-	-	-	-	-
	NÚCLEO	+++	+++	++	++	++	+
MUSCULAR CIRCULAR	CITOPLASMA	+	+	+	-	-	+
	NÚCLEO	+	++	+	+	+	+
PLEXO MIOENTÉRICO	CITOPLASMA	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	NÚCLEO	++	+++	+++	++	++	++
MUSCULAR LONGITUDINAL	CITOPLASMA	++	++	+++	++	++	++
	NÚCLEO	++	++	+++	++	++	++
SEROSA	CITOPLASMA	-	-	-	-	-	-
	NÚCLEO	+++	+++	+	+++	+++	+++
ENDOTÉLIO VASCULAR	CITOPLASMA	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	NÚCLEO	+++	+++	+++	+++	+++	+++

QUADRO 5- Marcação pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos cortes positivos das células de diferentes camadas do jejuno no animal “D”, em cinco momentos de coleta diferentes.

CAMADA		REGIÃO DA CÉLULA	ANIMAL “D” MOMENTO (TEMPO)				
			D1	D2	D3	D4	D5
MUCOSA	ENTEROCITOS VILOSIDADES	CITOPLASMA	+++	+++	+++	+++	+++
		NÚCLEO	+	+	++	++	+++
	LÂMINA PRÓPRIA	CITOPLASMA	+	++	++	+	++
		NÚCLEO	+	+	++	+	+
	CRIPTAS DE LIEBERKUHN	CITOPLASMA	++	++	++	+++	+++
		NÚCLEO	+	+	+++	+	+
MUSCULAR DA MUCOSA	CITOPLASMA	+	-	++	-	-	-
	NÚCLEO	-	+	-	+	+	+
SUBMUCOSA	CITOPLASMA	-	-	+	-	-	-
	NÚCLEO	++	++	-	++	++	++
MUSCULAR CIRCULAR	CITOPLASMA	+	+	+	+	+	+
	NÚCLEO	++	++	++	++	++	++
PLEXO MIOENTÉRICO	CITOPLASMA	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	NÚCLEO	+++	++	+++	+++	+++	+++
MUSCULAR LONGITUDINAL	CITOPLASMA	+	+++	+++	+++	+++	+++
	NÚCLEO	+	+++	+++	+++	+++	+++
SEROSA	CITOPLASMA	-	-	-	-	-	-
	NÚCLEO	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ENDOTÉLIO VASCULAR	CITOPLASMA	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	NÚCLEO	+++	+++	+++	+++	+++	+++

QUADRO 6- Marcação pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos cortes positivos das células de diferentes camadas do jejuno no animal “E”, em cinco momentos de coleta diferentes.

CAMADA		REGIÃO DA CÉLULA	ANIMAL “E” MOMENTO (TEMPO)				
			E1	E2	E3	E4	E5
MUCOSA	ENTEROCITOS VILOSIDADES	CITOPLASMA	++	+++	+++	+++	+++
		NÚCLEO	++	+	++	++	++
	LÂMINA PRÓPRIA	CITOPLASMA	++	+	++	++	++
		NÚCLEO	++	+	+	++	++
	CRIPTAS DE LIEBERKUHN	CITOPLASMA	++	++	++	+++	+++
		NÚCLEO	+	+	++	++	++
MUSCULAR DA MUCOSA	CITOPLASMA	+	+	+	+	+	+
	NÚCLEO	+	+	+	++	++	+++
SUBMUCOSA	CITOPLASMA	-	-	-	-	-	-
	NÚCLEO	+++	++	++	+++	+++	+++
MUSCULAR CIRCULAR	CITOPLASMA	+	+	+	+	+	+
	NÚCLEO	++	+	++	+++	+++	+++
PLEXO MIOENTÉRICO	CITOPLASMA	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	NÚCLEO	++	+++	+++	+++	+++	+++
MUSCULAR LONGITUDINAL	CITOPLASMA	+	+	+++	+++	+++	++
	NÚCLEO	+	++	+++	+++	+++	+++
SEROSA	CITOPLASMA	-	-	-	-	-	-
	NÚCLEO	+++	+++	+++	+++	+++	++
ENDOTÉLIO VASCULAR	CITOPLASMA	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	NÚCLEO	+++	+++	+++	+++	+++	+++

QUADRO 7- Marcação pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos cortes positivos das células de diferentes camadas do jejuno no animal “F”, em cinco momentos de coleta diferentes.

CAMADA		REGIÃO DA CÉLULA	ANIMAL “F” MOMENTO (TEMPO)				
			F1	F2	F3	F4	F5
MUCOSA	ENTEROCITOS VILOSIDADES	CITOPLASMA	+++	+++	+++	+++	+++
		NÚCLEO	+	+	++	+	+++
	LÂMINA PRÓPRIA	CITOPLASMA	+	+	++	+	+
		NÚCLEO	+	+	+	+	++
	CRIPTAS DE LIEBERKUHN	CITOPLASMA	+++	+++	+++	+++	+++
		NÚCLEO	+	+	+	++	++
MUSCULAR DA MUCOSA	CITOPLASMA	-	-	-	+	-	
	NÚCLEO	+	++	++	++	++	+++
SUBMUCOSA	CITOPLASMA	-	-	-	-	-	-
	NÚCLEO	++	++	++	++	++	++
MUSCULAR CIRCULAR	CITOPLASMA	+	+	+	+	+	+
	NÚCLEO	+	+++	+++	+++	+++	+++
PLEXO MIOENTÉRICO	CITOPLASMA	+++	++	+++	+++	+++	+++
	NÚCLEO	++	++	++	+++	+++	+++
MUSCULAR LONGITUDINAL	CITOPLASMA	++	++	+	++	+	
	NÚCLEO	++	++	+++	++	++	+
SEROSA	CITOPLASMA	-	-	-	-	-	-
	NÚCLEO	+++	+++	+++	+++	+++	++
ENDOTÉLIO VASCULAR	CITOPLASMA	+++	+++	+++	+++	+++	+++
	NÚCLEO	+++	+++	+++	+++	+++	+++

QUADRO 8- Marcação pelo anticorpo policlonal anti-phospho-p44/42 nos cortes positivos das células de diferentes camadas do jejuno no animal “G”, em cinco momentos de coleta diferentes.

CAMADA		REGIÃO DA CÉLULA	ANIMAL “G” MOMENTO (TEMPO)				
			G1	G2	G3	G4	G5
MUCOSA	ENTEROCITOS VILOSIDADES	CITOPLASMA	+++	+++	+++	+++	+++
		NÚCLEO	+	+	+	+	++
	LÂMINA PRÓPRIA	CITOPLASMA	+	+	+	+	+
		NÚCLEO	+	+	+	+	++
	CRIPTAS DE LIEBERKUHN	CITOPLASMA	++	++	+++	+	++
		NÚCLEO	+	+	+	-	+
MUSCULAR DA MUCOSA	CITOPLASMA	-	+	+	+	+	-
	NÚCLEO	+	++	++	++	++	++
SUBMUCOSA	CITOPLASMA	-	-	-	-	-	-
	NÚCLEO	++	++	++	++	++	++
MUSCULAR CIRCULAR	CITOPLASMA	+	+	+	+	+	++
	NÚCLEO	++	+++	++	+++	+++	+++
PLEXO MIOENTÉRICO	CITOPLASMA	++	+++	++	+++	+++	+++
	NÚCLEO	++	+	++	+++	+++	+++
MUSCULAR LONGITUDINAL	CITOPLASMA	+	+	+++	+++	+++	+++
	NÚCLEO	++	++	+++	+++	+++	+++
SEROSA	CITOPLASMA	-	-	-	-	-	-
	NÚCLEO	+++	+++	+++	+++	+++	+++
ENDOTÉLIO VASCULAR	CITOPLASMA	+++	++	++	+++	+++	+++
	NÚCLEO	+++	+++	++	+++	+++	+++