

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MATHEUS MARTIN MACRI

**Influência do pneumoperitônio nas funções hepática e renal e na liberação de citocinas pró-inflamatórias na endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* em ratos.**

CURITIBA

2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ**

**MATHEUS MARTIN MACRI**

**Influência do pneumoperitônio nas funções hepática e renal e na liberação de citocinas pró-inflamatórias na endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* em ratos.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Co-Orientador: Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka

Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

**CURITIBA**

**2008**

---

*Aos meus pais Maria Tereza e Antonio,  
pela dedicação e confiança.*

*À minha esposa Marina, pelo apoio e  
incentivo sempre constantes.*

---

## AGRADECIMENTOS

*Consigno aqui, cumprindo um dever gratíssimo, os meus agradecimentos a todos que contribuíram para a execução deste estudo.*

- Ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.
  - À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
  - Ao Hospital e Maternidade Angelina Caron
  - Ao Professor Doutor Jorge Fouto Matias.
  - Ao Professor Doutor João Carlos Domingues Repka.
  - Ao Doutor Pedro Ernesto Caron.
  - Ao Doutor Carlos José Franco de Souza.
  - À Bibliotecária Áurea Costin.
  - À Secretária do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Regina Sass.
  - Aos meus amigos e colegas-médicos Marlus Moreira, Marco Antonio Caron Filho e Gustavo Marchesine Paul.
-

*“... que tipo de substância poderia desencadear efeitos tão avassaladores em  
quantidades tão pequenas ...”*

*Richard Pfeiffer (Berlin, 1895)*

---

## RESUMO

### Influência do pneumoperitônio nas funções hepática e renal e na liberação de citocinas pró-inflamatórias em modelo de endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*.

**Introdução:** A videocirurgia oferece vantagens sobre a via convencional em diversos aspectos e é cada vez mais utilizada, inclusive em pacientes infectados. Contudo, nestes pacientes, não são conhecidas as conseqüências da ocorrência simultânea do pneumoperitônio e de citocinas pró-inflamatórias circulantes sobre as funções hepática e renal, resultantes do estímulo inflamatório induzido pelo lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*. **Objetivo:** Analisar a contribuição da criação do pneumoperitônio (PP) na liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL6) e seus efeitos nas funções hepática e renal em modelo experimental de endotoxemia causada por lipopolissacarídeo (LPS). **Material e Método:** Foram utilizados 32 ratos Wistar dos quais foi coletado sangue 24 horas prévias ao experimento para as avaliações iniciais da função renal (dosagens de uréia e creatinina), da função hepática (determinação do tempo de ação da protrombina - TAP), dosagens de bilirrubina total e direta, transaminases e do estado endotóxico (contagens total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas e dosagens de LPS, TNF $\alpha$ , IL<sub>6</sub>). A seguir os ratos foram separados em quatro grupos, todos com oito ratos: grupos controle inoculados com LPS (10mg/kg via ip.) e mantidos por quatro e 11 horas (C-LPS<sub>4</sub> e C-LPS<sub>11</sub>). Grupo C-PP, controle do PP por dióxido de carbono a 10mmHg por uma hora e mantido sob observação por seis horas. Grupo experimento (E) no qual os ratos foram inoculados com 10mg/kg de LPS por via ip. e após quatro horas foram submetidos ao PP por dióxido de carbono a 10mmHg por uma hora e mantido sob observação por seis horas. Ao término destes períodos foram coletadas amostras de sangue para as mesmas avaliações iniciais. Utilizou-se o teste de T-Student para as comparações estatísticas dos resultados, com nível de significância de 0,05. **Resultados:** Em comparação aos valores iniciais e aos grupos controle, o grupo E apresentou maiores valores nas provas de função renal (creatinina= 0,85  $\pm$  0,24 e uréia= 106,38  $\pm$  37,61 mg/dl). Nas provas de função hepática, maiores valores nas dosagens de bilirrubina direta (0,34  $\pm$  0,09mg/dl), ALT (390,38  $\pm$  351,88) e TAP (17,01  $\pm$  2,18). O estado endotóxico foi confirmado pelas dosagens de IL6 (36,0  $\pm$  11,23 pg/ml), TNF $\alpha$  (518,36  $\pm$  203,39 pg/ml) e pelas alterações hematológicas: diminuição de plaquetas, aumento de leucócitos e bastonetes e detecção de endotoxina circulante (0,21  $\pm$  0,08 UE/ml). **Conclusão:** O pneumoperitônio por dióxido de carbono induz: aumentos na liberação de TNF $\alpha$ , IL6, piora das funções hepática e renal em modelo experimental de endotoxemia induzida por LPS.

**Descritores :** ratos, pneumoperitônio, dióxido de carbono, sepse, lipopolissacarídeo, fator de necrose tumoral alfa, interleucina 6.

---

## ABSTRACT

### **Influence of pneumoperitoneum on the hepatic and renal functions and the release of pro-inflammatory cytokines in the endotoxemia model induced by lipopolyssacharide from *Escherichia coli*.**

**Introduction:** Videosurgery offers advantages over conventional surgery in a number of aspects and is becoming increasingly more frequent, even for infected patients. However, for such patients, what is not known are the consequences of the simultaneous occurrence of pneumoperitoneum and pro-inflammatory circulating cytokines resulting from the inflammatory stimulus induced by lipopolyssacharide (LPS) from *Escherichia coli*. **Aim:** to analyze the contribution of the creation of pneumoperitoneum (PP) in the release of tumor necrosis factor-alpha (TNF $\alpha$ ) and interleukin 6 (IL6) and their deleterious effects on the hepatic and renal functions in an endotoxemia experimental model caused by lipopolyssacharide (LPS). **Material and Method:** Thirty-two Wistar rats were utilized, from which blood was collected twenty-four hours prior to the experiment for the initial evaluations of the renal function (dosages of urea and creatinine), the hepatic function (dosages of total and direct bilirubin, transaminases and determination of the time of action of prothrombin - TAP) and the endotoxic state (total counts and differential of leukocytes, platelet count and dosages of LPS, TNF $\alpha$ , IL $_6$ ). The rats were then separated into four groups of eight: control groups inoculated with LPS (10mg/kg via ip.) and kept for four and eleven hours (C-LPS $_4$  and C-LPS $_{11}$ ). Group C-PP, control of PP by carbon dioxide at 10mmHg for one hour and kept under observation for six hours. Experiment group (E) in which the rats were inoculated with 10mg/kg of LPS via ip. and after four hours were submitted to PP by carbon dioxide at 10mmHg for one hour and kept under observation for six hours. At the end of these periods, blood samples were collected for the same initial evaluations. The T-student method was utilized for statistical comparisons of results, with a significance level of 0.05. **Results:** Compared to the initial values and the control groups, Group E had higher values in the renal function tests (creatinine=  $0.85 \pm 0.24$  and urea =  $106.38 \pm 37.61$  mg/dl). In the hepatic function tests, there were higher values in the dosages of direct bilirubin ( $0.34 \pm 0.09$ mg/dl), ALT ( $390,38 \pm 351.88$ ) and TAP ( $17.01 \pm 2.18$ ). The endotoxic state was confirmed by the dosages of IL6 ( $36.0 \pm 11.23$  pg/ml), TNF $\alpha$  ( $518.36 \pm 203.39$  pg/ml) and by the hematological alterations: reduction of platelets, increased leukocytes and band neutrophils and the detection of circulating endotoxin ( $0.21 \pm 0.08$  UE/ml). **Conclusion:** Pneumoperitoneum by carbon dioxide induces: increased release of TNF $\alpha$ , IL6, worsens the hepatic and renal function in the experimental endotoxemia model induced by LPS.

**Key Words :** rats, pneumoperitoneum, carbon dioxide, sepsis, lipopolyssacharide, tumor necrosis factor-alpha, interleukin 6.

---

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	MODELO ESTRUTURAL DA PAREDE CELULAR DA <i>Escherichia coli</i> , DESTACANDO O LIPOPOLISSACARÍDEO, CONFORME PROPOSIÇÃO DE RAETZ & WHITFIELD (2002) .....	5
Figura 2-	INDUÇÃO DE PNEUMOPERITÔNIO EM 13 RATOS SIMULTANEAMENTE .....	19

---



## LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 -	DEMONSTRATIVO DA ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ANIMAIS .....	17
TABELA 1 -	DILUIÇÕES DA ENDOTOXINA PADRÃO .....	28
TABELA 2 -	DEMONSTRATIVO DAS COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE AS DOSAGENS DE CREATININA .....	32
TABELA 3 -	DEMONSTRATIVO DAS COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE AS DOSAGENS DE URÉIA .....	32
TABELA 4 -	DEMONSTRATIVO DAS COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE AS DOSAGENS DE BILIRRUBINA DIRETA .....	34
TABELA 5 -	DEMONSTRATIVO DAS COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE AS DOSAGENS DE BILIRRUBINA TOTAL .....	34
TABELA 6 -	DEMONSTRATIVO DAS COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE AS DOSAGENS DE ALANINA AMINOTRANSFERASE ...	35
TABELA 7 -	DEMONSTRATIVO DAS COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE AS DOSAGENS DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASE .....	36
TABELA 8 -	DEMONSTRATIVO DAS COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE AS DETERMINAÇÕES DO TEMPO DE AÇÃO DA PROTROMBINA .....	37
TABELA 9 -	DEMONSTRATIVO DAS COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE AS DOSAGENS DE INTERLEUCINA 6 .....	38
TABELA 10 -	DEMONSTRATIVO DAS COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE AS DOSAGENS DE FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA .....	39
TABELA 11 -	DEMONSTRATIVO DAS COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS ENTRE AS CONTAGENS DE PLAQUETAS .....	40
TABELA 12 -	DEMONSTRATIVO DAS COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS CONTAGENS DE LEUCÓCITOS .....	41
TABELA 13 -	DEMONSTRATIVO DAS COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS PORCENTAGENS DE BASTONETES .....	42
TABELA 14 -	DEMONSTRATIVO DAS COMPARAÇÕES ESTATÍSTICAS DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINA .....	43
ANEXO 2-	OBTENÇÃO DOS VALORES INICIAIS DAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS .....	61
ANEXO 3-	OBTENÇÃO DOS VALORES DE REFERÊNCIA PARA AS CONTAGENS HEMATOLÓGICAS .....	63

---

ANEXO 4-	RESULTADOS OBTIDOS NAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS NO GRUPO CONTROLE SUBMETIDO AO PNEUMOPERITÔNIO POR UMA HORA A 10mmHg .....	63
ANEXO 5-	RESULTADOS OBTIDOS NAS CONTAGENS HEMATOLÓGICAS NO GRUPO CONTROLE SUBMETIDO AO PNEUMOPERITÔNIO POR UMA HORA A 10mmHg .....	63
ANEXO 6-	RESULTADOS DAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS OBTIDOS NO GRUPO CONTROLE SUBMETIDO À INOCULAÇÃO DE LPS E MANTIDOS POR 4 HORAS .....	64
ANEXO 7-	RESULTADOS DAS CONTAGENS HEMATOLÓGICAS OBTIDOS NO GRUPO CONTROLE SUBMETIDO À INOCULAÇÃO DE LPS E MANTIDOS POR 4 HORAS .....	64
ANEXO 8-	RESULTADOS OBTIDOS DAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS NO GRUPO CONTROLE SUBMETIDO À INOCULAÇÃO DE LPS POR E MANTIDOS POR 11 HORAS .....	65
ANEXO 9-	RESULTADOS OBTIDOS DAS CONTAGENS HEMATOLÓGICAS NO GRUPO CONTROLE SUBMETIDO À INOCULAÇÃO DE LPS POR E MANTIDOS POR 11 HORAS .....	65
ANEXO 10-	RESULTADOS OBTIDOS DAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS NO GRUPO EXPERIMENTO SUBMETIDO À INOCULAÇÃO DE LPS E PNEUMOPERITÔNIO .....	66
ANEXO 11-	RESULTADOS OBTIDOS DAS CONTAGENS HEMATOLÓGICAS NO GRUPO EXPERIMENTO SUBMETIDO À INOCULAÇÃO DE LPS E PNEUMOPERITÔNIO .....	66
ANEXO 12-	AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS .....	67

---

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE TNF $\alpha$ EM DENSIDADE ÓPTICA DE 450 nm .....	24
GRÁFICO 2 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE IL6 EM DENSIDADE ÓPTICA DE 450nm .....	26
GRÁFICO 3 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS DILUIÇÕES DA ENDOTOXINA PADRÃO (UE/ml) .....	28
GRÁFICO 4 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE CREATININA .....	31
GRÁFICO 5 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE URÉIA .....	32
GRÁFICO 6 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE BILIRRUBINA DIRETA .....	33
GRÁFICO 7 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE BILIRRUBINA TOTAL .....	34
GRÁFICO 8 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE ALANINA AMINOTRANSFERASE (ALT) .....	35
GRÁFICO 9 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE ASPARTATO AMINOTRANSFERASE (AST) .....	36
GRÁFICO 10 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DETERMINAÇÕES DO TEMPO DE AÇÃO DA PROTROMBINA EM SEGUNDOS (TAP) .....	37
GRÁFICO 11 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DETERMINAÇÕES DA INTERLEUCINA 6 EM pg/ml (IL6) .....	38
GRÁFICO 12 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DETERMINAÇÕES DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM pg/ml (TNF $\alpha$ ) .....	39
GRÁFICO 13 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS CONTAGENS DE PLAQUETAS /mm <sup>3</sup> .....	40
GRÁFICO 14 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS CONTAGENS DE LEUCÓCITOS /mm <sup>3</sup> .....	41
GRÁFICO 15 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS PORCENTAGENS DE BASTONETES .....	42
GRÁFICO 16 -	REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINA (UE/ml) .....	43

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	-	Difosfato de adenosina
AMP	-	Monofosfato de adenosina
ATP	-	Trifosfato de adenosina
CD	-	Clone de diferenciação
CO <sub>2</sub>	-	Dióxido de Carbono
EAO	-	Espécies ativas de oxigênio
EDTA	-	Ácido etileno diamino tetra acético
FC	-	Frequência cardíaca
FR	-	Frequência respiratória
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	-	Bicarbonato
IF	-	Interferon
IL	-	Interleucina
IRAK	-	Serina-treonina-proteína-quinase do receptor de IL-1
LAL	-	Lisado amebóide de <i>Limulus sp</i>
LPS	-	Lipopolissacarídeo – endotoxina
MDO	-	Malondialdeído
mmHg	-	Milímetros de Mercúrio
NAD	-	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NDAH	-	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NF κβ	-	Fator nuclear de transcrição κβ
nmol/mg	-	Nano mol por miligrama
NO	-	Óxido nítrico
p	-	Significância estatística
PAF	-	Fator agregador de plaquetas
PAM	-	Pressão arterial média
PCK	-	Proteínas quinases C
pCO <sub>2</sub>	-	Pressão parcial de gás carbônico
pg/ml	-	Picograma por mililitro
pH	-	Potencial hidrogeniônico
PMN	-	Polimorfonuclear
PVC	-	Pressão venosa central
RNA <sub>m</sub>	-	Ácido ribonucléico mensageiro
rpm	-	Rotações por minuto
SF	-	Solução salina isotônica ou soro fisiológico
SO <sub>2</sub>	-	Saturação de oxigênio no sangue arterial
SOD	-	Superóxido dismutase
spO <sub>2</sub>	-	Saturação de oxigênio periférico
SRE	-	Sistema retículo endotelial
TB	-	Translocação bacteriana
TBARS	-	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TLR	-	Receptor “ <i>tool like</i> ”
TNFα	-	Fator de necrose tumoral alfa
UE/ml	-	Unidade endotóxicas por mililitro

---

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Objetivos .....	3
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>4</b>
2.1 ENDOTOXINA BACTERIANA .....	4
2.2 CIRURGIA VIDEOLAPAROSCÓPICA E A INDUÇÃO EXPERIMENTAL DE PNEUMOPERITÔNIO .....	9
<b>3 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>17</b>
3.1 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA E ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO ....	17
3.2 NORMAS APLICADAS .....	18
3.3 INDUÇÃO DE PNEUMOPERITÔNIO .....	18
3.4 INDUÇÃO DE ENDOTOXEMIA PELO LPS .....	20
3.4.1 Preparação do inóculo de lipopolissacarídeo (LPS) .....	20
3.4.2 Material .....	20
3.4.3 Método .....	20
3.4.4 Inoculação .....	20
3.5 AFERIÇÕES .....	21
3.5.1. Coleta de sangue .....	21
3.5.2 Dosagem do fator de necrose tumoral alfa .....	22
3.5.2.1 Materiais .....	23
3.5.2.2 Método .....	23
3.5.3 Dosagem de interleucina 6 .....	24
3.5.3.1 Materiais .....	25
3.5.3.2 Método .....	25
3.5.4. Dosagem de Endotoxina – LPS .....	26
3.5.4.1 Material .....	27
3.5.4.2 Método .....	27
3.5.5 Avaliações Bioquímicas e Hematológicas .....	29
3.5.5.2 Dosagens de Uréia e Creatinina .....	29
3.5.5.3 Contagem de Leucócitos e Plaquetas .....	30
3.5.5.4 Contagem de Bastonetes .....	30
3.5.5.5 Avaliação do Tempo de Ação da Protrombina .....	30
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	30
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>31</b>
4.1 MORTALIDADE E SOBREVIVÊNCIA .....	31
4.2 PROVAS DE FUNÇÃO RENAL .....	31
4.2.1 Dosagens de Creatinina .....	31

---

4.2.2 Dosagens de Uréia .....	32
4.3 PROVAS DE FUNÇÃO HEPÁTICA .....	33
4.3.1 Dosagens de Bilirrubina Direta .....	33
4.3.2 Dosagens de Bilirrubina Total .....	34
4.3.3 Dosagens de Alanina Aminotransferase .....	35
4.3.4 Dosagens de Aspartato Aminotransferase .....	36
4.3.5 Determinação do Tempo de Ação da Protrombina .....	37
4.5 DOSAGENS DE INTERLEUCINA 6 .....	38
4.6 DOSAGENS DE FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA .....	39
4.7 AVALIAÇÕES HEMATOLÓGICAS .....	40
4.7.1 Contagem de Plaquetas .....	40
4.7.2 Contagem de Leucócitos .....	41
4.7.3 Contagem de Bastonetes .....	42
4.7 DOSAGEM DE ENDOTOXINA .....	43
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
5.1 O MODELO ANIMAL DE PNEUMOPERITÔNIO .....	45
5.2 EFEITOS DE PNEUMOPERITÔNIO E DA ENDOTOXEMIA .....	45
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>59</b>

---

## ***1 Introdução***

---

---

A primeira laparoscopia historicamente realizada foi descrita no início do século XX, pelo cirurgião alemão George Kelling em 1901, em cães, com o interesse em estancar hemorragia gástrica por meio do pneumoperitônio entre 50 a 60mmHg, técnica que intitulou celioscopia. É digno de nota que o autor não mediu pressões venosas, não tendo relatado os efeitos hemodinâmicos deletérios do pneumoperitônio alto (ROSENTHAL, FRIEDMAN e PHILLIPS, 1998).

Em 1911, a laparoscopia era utilizada somente para procedimentos diagnósticos, empregando apenas a óptica, naquele ano Jacobeus publicou a primeira série de casos em humanos, em que utilizou tanto a laparoscopia como a toracoscopia para procedimentos diagnósticos. A laparoscopia cirúrgica iniciou-se com Semm em 1977, que realizou a primeira apendicectomia em 1983, o que despertou o interesse de alguns e a perplexidade de muitos, contudo, não recebeu aceitação mundial. Entretanto, a primeira videolaparoscopia com uso de monitor foi creditada em 1987 a Phillip Mouret, ginecologista francês que realizou a primeira colecistectomia laparoscópica em doente com vesícula pediculada e presa ao fígado somente pelo peritônio, trabalho jamais publicado, que foi mencionado em 1989 por Dubois (KAWAHARA, ALSTER & FONTES, 2007).

Reconheceu-se a partir de então, que aquela via de acesso cirúrgico oferecia diversas vantagens sobre a via convencional em aspectos como: dor pós-operatória menos intensa, diminuição da permanência hospitalar, retorno precoce às atividades habituais e aspectos estéticos mais favoráveis (ROSENTHAL, FRIEDMAN e PHILLIPS, 1998).

Atualmente esta via é amplamente empregada como ferramentas diagnósticas ou como método de acesso cirúrgico (BERGAMASCHI *et al.*, 2001) e conforme descrito por Guarischi (2007), o papel da videocirurgia, no diagnóstico e estadiamento das neoplasias abdominais e torácicas, também está consolidado, por permitir uma recuperação mais rápida e o eventual início de tratamento complementar mais precoce.

Este procedimento pode apresentar complicações inerentes ao método e dentre elas destacam-se as relacionadas ao aumento da pressão na cavidade intra-abdominal, caracterizadas pela ocorrência de enfisema parietal, injeção de gás no omento,

---



---

no interior de um órgão abdominal ou grande vaso, complicações respiratórias devido a elevação da cúpula diafragmática, hipofluxo esplâncnico levando a hipoperfusão de órgãos abdominais e intestinos com alterações dos componentes da barreira intestinal, alterações circulatórias causadas pela compressão da veia cava inferior e como efeito cascata, verifica-se redução do débito cardíaco, bradicardia e possível parada cardíaca (ROSENTHAL, FRIEDMAN e PHILLIPS, 1998).

Há cerca de 10 anos considerava-se como contra-indicação absoluta da colecistectomia laparoscópica situações como gravidez, cirurgia abdominal prévia, intolerância ao aumento da pressão intra-abdominal, obstrução intestinal, coagulopatia, obesidade, cirrose, intolerância à anestesia geral, coledocolitíase e colecistite aguda. Com o passar dos anos, a maior experiência do cirurgião com o método e o melhor conhecimento e controle das repercussões do pneumoperitônio pelo anestesista, ampliaram as indicações dos procedimentos laparoscópicos e restringiram suas contraindicações. Recentemente a laparoscopia vem sendo utilizada na definição diagnóstica, mesmo em pacientes críticos com quadro séptico (MELO, ALBUQUERQUE & GONDIM, 2003).

Com o advento da antibioticoterapia, desde a metade do século passado os índices de morbi-mortalidade associados às infecções reduziram-se significativamente, contudo, permanecem desafiantes os quadros infecciosos seguidos de sepse.

Nos Estados Unidos, ANGUS *et al.*, (2001) estimaram a incidência anual de 751.000 casos (3 casos/1.000 população) e evolução para óbito em 215.000 casos (28,6%). No Brasil, por não ser uma doença de notificação compulsória não se conhece a real incidência da sepse na população em geral. SILVA *et al.*, (2004) evidenciaram o elevado impacto econômico e social que a sepse acarreta por ser uma das mais elevadas taxas de incidência no mundo, com os pacientes mais graves e com tempo de internação maior que em outros países.

Atualmente sabe-se que a endotoxina bacteriana, também conhecida como lipopolissacarídeo (LPS) é um componente da parede celular de bactérias

---

Gram-negativas e que, *per se*, é capaz de desencadear mecanismos indutores de reações inflamatórias graves, os quais se sobrepõem aos sintomas da infecção sistêmica pré-existente. Assim sendo, a definição de sepse<sup>1</sup>, de acordo com o Consenso Brasileiro de Sepse é “*resposta inflamatória sistêmica exagerada, secundária à infecção grave documentada*”.

A endotoxina é responsável pela ativação de mediadores endógenos secretados por células inflamatórias ativadas, identificados como citocinas, e entre estas destacam-se o fator de necrose tumoral alfa e a interleucina 6 (TNF $\alpha$  e IL6) (ABBAS & LICHTMAN, 2004). Estas citocinas são as responsáveis pela eclosão de diversas alterações clínicas na sepse como a febre ou hipotermia, as alterações funcionais como oligúria, taquipnéia, hipoxemia, taquicardia, hipotensão, acidose láctica e coagulopatia entre outros.

Não é infreqüente a utilização da videolaparoscopia em pacientes sépticos, seja para a resolução do foco infeccioso ou para avaliação diagnóstica (MELO, ALBUQUERQUE & GONDIM, 2003), e desconhece-se ainda, os efeitos da associação do pneumoperitônio em condições de resposta inflamatória sistêmica secundária em vigência de endotoxemia.

### **1.1. Objetivo :**

Analisar o efeito da criação do pneumoperitônio (PP) na liberação de fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) e interleucina 6 (IL6) e sua influencia nas funções hepática e renal em modelo experimental de endotoxemia causada por lipopolissacarídeo (LPS).

---

<sup>1</sup> Do Grego “podridão” – matéria orgânica em decomposição.

---

## ***2 Revisão da Literatura***

---

## 2.1 ENDOTOXINA BACTERIANA

O estudo das bactérias e seus efeitos deletérios no organismo humano teve grande avanço no final do século XIX, quando os bacteriologistas passaram a estudar as substâncias excretadas por estes microorganismos. Estas substâncias, denominadas exotoxinas, tinham como ponto comum a inativação pelo aquecimento. Nesse período descobriu-se que outra substância liberada somente pela lise bacteriana era resistente ao calor e se mostrava capaz de produzir efeitos biológicos importantes como febre e choque circulatório. Esta substância foi denominada de endotoxina (AKAMINE *et al.*, 1998).

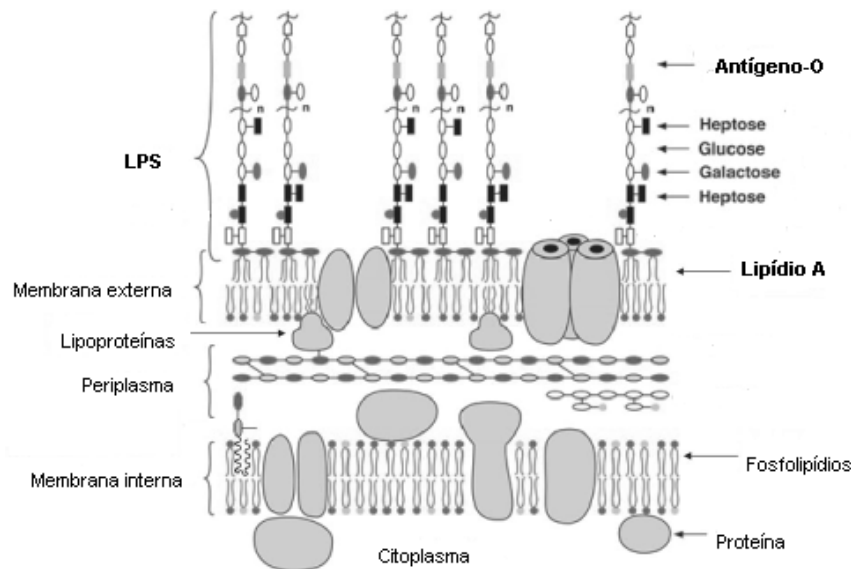
A endotoxina é um dos componentes da membrana externa da parede celular de bactérias Gram-negativas e também denominada de lipopolissacarídeo(LPS), devido à sua conformação bioquímica (FREUNDENBERG & GALANOS, 1990). Seus efeitos no hospedeiro são dependentes das doses liberadas. A liberação de grandes quantidades resulta em sepse e suas complicações: síndrome da resposta inflamatória sistêmica e choque séptico caracterizado por hipotensão, coagulação intra-vascular disseminada, falência de múltiplos órgãos e morte (PARILLO, 1993). Entretanto, existe contato permanente entre o organismo humano ou animal com a endotoxina. Devido à presença de bactérias Gram-negativas no trato gastrointestinal e na pele do homem e dos animais, estas pequenas quantidades de endotoxinas liberadas podem determinar aumento de resistência às infecções e apresentar atividade anti-tumoral (NOLAN,1981).

O LPS é uma toxina termo-estável, composta por três subunidades: uma cadeia polissacarídica superficial, dita antígeno "O", responsável pela variabilidade antigênica das bactérias Gram-negativas, uma ponte também polissacarídica de localização intermediária e finalmente, o fosfolípido A, inserido na membrana externa e responsável pela sensibilização do hospedeiro (RAETZ & WHITFIELD, 2002) (Figura 1).

O lipídio A é a porção com menor variação estrutural, responsável por todos efeitos maléficos e benéficos descritos até hoje. Constituído principalmente de glucosamina e fosfato, associado a um ácido graxo que contém 14 átomos de carbono. A liberação do

---

lipídio A, separando-se da parede bacteriana, é necessária para que a molécula se torne ativa, fenômeno que ocorre somente quando as bactérias morrem ou se multiplicam.



**FIGURA 1: MODELO ESTRUTURAL DA PAREDE CELULAR DA *Escherichia coli*, DESTACANDO O LIPOPOLISSACARÍDEO, CONFORME PROPOSIÇÃO DE RAETZ & WHITFIELD (2002).**

O LPS bem como os demais fragmentos de bactérias são capazes de induzir células mononucleares humanas a produzir interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), que são citocinas integrantes da resposta imune. Dentre os múltiplos efeitos biológicos da IL-1 destacam-se a febre (ação no hipotálamo), a neutrofilia (ação na medula óssea), a proliferação de colágeno (estímulo de fibroblastos), a liberação de aminoácidos de músculos, a produção de IL-2 (ação nas células T), e a produção de anticorpos (ação nas células B) (DINARELLO, 1997).

O LPS interage com vários sistemas celulares e humorais. Após penetrar na circulação, liga-se a lipoproteínas plasmáticas, resultando em redução de sua atividade biológica. Mesmo assim ativam o complemento, induzem a coagulação, afetam a função hepática e o sistema neuro-endócrino. Esta diversidade de respostas fisiológicas é direcionada à eliminação de endotoxinas, seus fragmentos, e até mesmo bactérias gram-

---

negativas, e a seguir promover o reparo das lesões teciduais. Porém, devido às altas concentrações ou maior sensibilidade a endotoxinas, as ações dos sistemas de defesa tornam-se incontroláveis e, ao invés de contribuir, muitas destas respostas acabam sendo deletérias ao paciente, como a reação inflamatória sistêmica.

A resposta pirogênica é o efeito mais conhecido, mas apenas um dos vários efeitos produzidos pelas endotoxinas. Elas também induzem os macrófagos do Sistema Retículo Endotelial (SRE) a liberar fatores antagonistas a glicocorticóide, fatores “insulina-like”, fatores coagulantes, os quais, em conjunto determinam piora do quadro clínico por estarem relacionados com coagulação dentro de capilares, liberação de prostaglandinas, óxido nítrico (indutor de vasodilatação sistêmica e hipotensão no choque endotóxico), superóxidos e enzimas lisossômicas. Enfim, estas substâncias introduzidas iatrogenicamente, na corrente circulatória de pacientes em hemodiálise produzem tantos efeitos e afetam tantos sistemas que tornam difícil precisar e caracterizar um diagnóstico (DINARELLO, 1977).

Durante o processo infeccioso, o organismo agredido entra em contato com o LPS no local da infecção e sistemicamente, através dos fragmentos bacterianos presentes na corrente sangüínea, liberados por ocasião do crescimento e multiplicação das bactérias. Após estudar a resposta de diversas células às endotoxinas, constatou-se que entre estas, os macrófagos são os mais ativados. DECKER, 1989, relatou que a endotoxina tem a capacidade de estimular as células de Kupffer a produzirem e liberarem citocinas como  $TNF\alpha$ , interferon  $\alpha/\beta$  e IL-1. A interação da endotoxina com os macrófagos é, provavelmente, o principal fator da resposta inflamatória e do choque endotóxico.

O principal receptor para o LPS é o CD14, que é uma glicoproteína presente na superfície dos macrófagos e monócitos. Estudos com macrófagos normais e deficientes em CD14, mostraram que baixas doses de LPS necessitam da expressão do CD14, enquanto altas doses, podem desencadear a ativação dos macrófagos independente do receptor. GANGLOFF e colaboradores, 1999, determinaram se a variabilidade estrutural das moléculas de LPS, isoladas de diferentes espécies bacterianas, influenciavam a resposta

---

dos macrófagos via receptores CD14. O estudo com LPS purificado de *Escherichia coli*, *Salmonella abortus-equi*, *Salmonella minnesota*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria meningitidis*, *Bacteroides fragilis* e *Rhodobacter sphaeroides* mostrou que a resposta dependente do CD14 requer um antígeno "O" específico, caracterizada por uma cadeia de carboidrato longa, com pelo menos 6 cadeias de acil no lipídeo A. O LPS que não tem o antígeno "O" específico é caracterizado por uma cadeia de carboidrato curta indutora da ativação dos macrófagos, independentemente da presença do receptor CD14.

O LPS ligado aos receptores de membranas dos macrófagos induz a produção e secreção de glicoproteínas denominadas de citocinas. As citocinas têm ações locais e sistêmicas, controlando processos hormonais, imunológicos e inflamatórios. O TNF $\alpha$  é a primeira citocina a ser produzida durante o processo inflamatório e sua liberação irá induzir a síntese de diversas outras citocinas. A liberação de IL-1 também é precoce e, em conjunto com o TNF $\alpha$ , estimula a síntese e modula a expressão de outras citocinas. As citocinas, também denominadas pró-inflamatórias, como o TNF $\alpha$ , a IL-1, a IL-6 e a IL-8, interagem de forma a constituir um ciclo vicioso no seu próprio processo de produção e liberação. Embora estas substâncias sejam necessárias para a resposta de defesa adequada, sem o controle efetivo de sua produção elas induzirão estado de auto-agressão. Paralelamente, ocorre a indução de síntese das citocinas anti-inflamatórias, IL-4, IL-10 e IL-13. Do equilíbrio de forças entre as citocinas pró e anti-inflamatórias depende a homeostase do organismo (FADEL, 1996).

O início da resposta inflamatória ocorre quando o LPS liga-se à proteína ligadora de lipopolissacáride (LBP). O complexo LPS-LBP é então capaz de interagir com o receptor superficial celular denominado antígeno de diferenciação de agrupamentos 14 (CD14), que existe principalmente em fagócitos mononucleares e parece ser a maior superfície celular receptora para endotoxina (PETROIANU *et al.*, 2004; PACHECO, 2007). Embora tenha papel fundamental na resposta à endotoxina, o receptor CD 14 não tem habilidade para transmitir efetivamente a presença da toxina para o interior da célula. Sendo assim, há outro

receptor que é capaz de desempenhar esta função, chamado *Toll-like 4* (TLR-4) (DIKS *et al.*, 2004; GIACOMETTI *et al.*, 2005; TRIANTAFILOU *et al.*, 2005; LEU *et al.*, 2005; PACHECO, 2007).

Os receptores TLR compreendem uma família de receptores superficiais celulares de proteínas presentes em diferentes células, cuja função em mamíferos é reconhecer componentes moleculares de microorganismos. O TLR é o maior mecanismo molecular pelo qual o hospedeiro reconhece a invasão de um microorganismo. Esta informação é transmitida através da membrana celular e o sinal resultante é transmitido para o núcleo, a fim de que se inicie a resposta apropriada (WARREN, 2005). Recentemente levantou-se a hipótese de que o TLR4 é um crítico receptor para o LPS, sinalizando a defesa do hospedeiro e o sistema imunológico inativo que pode estar envolvido na regulação da imunidade adaptativa, sendo mediada pelos linfócitos B e T (OGIKUBO *et al.*, 2004).

A ativação celular desencadeada pelo LPS depende de três proteínas: CD14, TRL4 e MD2, formando o complexo receptor do LPS (BEUTLER, 2003). Uma vez ativado o complexo TRL-4, ocorre o recrutamento de uma proteína adaptativa denominada MyD88, a qual se associa à IRAK (serina-treonina-proteína-quinase do receptor de IL-1), que é fosforilada e se liga à uma proteína adaptativa denominada TRAF6 (fator de necrose tumoral associado ao fator 6). Esta associação leva à ativação de MAPquinasas, onde direta ou indiretamente irá ativar IKK1 e IKK2 (I kappa  $\beta$  Kinase 1 e 2), levando à ativação de NF $\kappa$  $\beta$  (fator nuclear kappa  $\beta$ ) e da proteína citoplasmática ligada a um inibidor (I $\kappa$ B). A ligação do LPS ao complexo TRL4 induz também sinais transmembrana, incluindo a mobilização de cálcio, ativação da proteína tirosina quinase (PTK) e de MAPquinasas e posterior ativação do fator NF $\kappa$  $\beta$  (MUROI & TANAMOTO, 2002; COHEN, 2002; WARREN, 2005).

A ativação da via das proteínas quinases C (PCK) leva à fosforilação do inibidor (I $\kappa$  $\beta$ ) e à dissociação do complexo, permitindo que o NF $\kappa$  $\beta$  migre para o núcleo e realize sua função (BEUTLER, 2002 e BEUTLER & RIETSCHHEL, 2003).



O NF $\kappa$ B regula a expressão de genes envolvidos nas respostas inflamatória e imunológica, aumentando a taxa de transcrição destes genes com conseqüente síntese de RNAm e proteínas, e tem papel importante na síntese dos mediadores pró-inflamatórios, além de regular a síntese de proteína C reativa (PCR) e iniciar a transcrição de citocinas com TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL2 e IL6 (GOSH & BALTIMORE, 1990).

Os macrófagos são importantes na remoção de partículas transportadas pelo sangue, incluindo LPS, da circulação porta e da circulação sistêmica. Essas células mononucleares são fundamentais na patogenia da endotoxemia, porque quando ativadas por endotoxina, liberam mediadores de peptídeo (citocinas), fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), eicosanóides e fator ativador de plaquetas. Através da liberação inicial desses mediadores peptídicos e lipídicos, os monócitos ativam os leucócitos, células endoteliais e plaquetas no hospedeiro, iniciando assim a resposta inflamatória. Os neutrófilos ativados contribuem através da liberação de enzimas proteolíticas e radicais livres de oxigênio reativos. Ainda, a endotoxina e o TNF estimulam a migração de neutrófilos e a aderência endotelial, que resulta na liberação de tromboplastina e na exposição de colágeno subendotelial, que ativam as cascatas intrínseca e extrínseca da coagulação (BENBAREK *et al.*, 1998; TIZARD, 1998; COHEN, 2002; BEUTLER & RIETSCHER, 2003; PETROIANU *et al.*, 2004; PACHECO, 2007).

## **2.2 CIRURGIA VIDEOLAPAROSCÓPICA E A INDUÇÃO EXPERIMENTAL DE PNEUMOPERITÔNIO**

Os avanços técnicos da laparoscopia, principalmente no que diz respeito ao processamento das imagens e à sua projeção em monitor de vídeo, com conseqüente visibilização simultânea das manobras operatórias por toda a equipe cirúrgica, propiciaram a realização de várias intervenções por este acesso cirúrgico.

Na França, em 1987, Philippe Mouret, *apud* ROSENTHAL, FRIEDMAN & PHILLIPS em 1998, realizou a primeira colecistectomia laparoscópica, sendo outro marco importante na história da cirurgia. Desde então, a aplicação da laparoscopia expandiu-se rapidamente, abrindo novas condições terapêuticas, diagnóstica e de pesquisa, e em função da experiência e da técnica, próprias de cada cirurgião, este procedimento cada vez mais se evidencia por apresentar vantagens em relação ao traumatismo operatório, restabelecimento pós-operatório, trauma peritoneal, formação de aderências, índice de infecção hospitalar e da incisão, preservação da dinâmica da parede abdominal, custo operacional global, tempo de internação, índice de complicações cárdio-vasculares e pulmonares em pacientes de alto risco como os idosos e cardiopatas, imunodepressão, dor no pós-operatório imediato e tardio e cicatriz operatória menos evidente.

Com o advento do método cirúrgico laparoscópico, diversos questionamentos começaram a emergir, em função de respostas indesejáveis obtidas em alguns serviços e assim novas publicações foram disponibilizadas fundamentalmente obtidas em modelos animais de pneumoperitônio.

CALDWELL & RICOTTA (1992), estudaram em cães a distribuição sangüínea nos órgãos-abdominais durante o pneumoperitônio. Utilizaram micro-esferas radioativas liberadas na corrente circulatória e submeteram os animais a valores pressóricos intraperitoneais crescentes de 20 e 40mmHg, através de insuflação de bolsas plásticas intra-abdominais. Evidenciaram a diminuição de fluxo sangüíneo para todos os órgãos, exceto supra-renais, com níveis de diminuição de fluxo mais significantes que os observados secundariamente à diminuição do débito cardíaco, sugerindo que o aumento da pressão intra-abdominal pode induzir isquemia visceral e disfunção orgânica.

BERGUER, CORNELIUS & DALTON (1997), submeteram ratos a diferentes níveis pressóricos intra-abdominais de 0, 2, 5, 10 e 15mmHg, por insuflação de CO<sub>2</sub>. Os animais foram mantidos anestesiados com ventilação espontânea. Foram medidas a freqüência cardíaca, pressão arterial, pH sangüíneo, PCO<sub>2</sub> e HCO<sub>3</sub>, por cateterização da artéria femoral

---

e veia jugular. Outro catéter foi instalado no arco aórtico para medir o débito e a frequência cardíacos. Observaram que os animais submetidos a pneumoperitônio acima de 10mmHg apresentavam acidose respiratória e bradicardia. Estes autores emitiram a hipótese de que em humanos pudessem ser utilizadas pressões superiores a 10mmHg, até 15mmHg, sem maiores efeitos adversos, desde que se controlasse a hipercarbia, ao contrário dos ratos do experimento, submetidos à ventilação espontânea. Este estudo serviu de base para diversos outros, pois estabeleceu o nível pressórico adequado para estudos experimentais de pneumoperitônio em ratos.

GOLDENBERG *et al.*, (1997) descreveram a possibilidade do uso da videolaparoscopia em ratos. Foram utilizados 10 ratos Wistar e empregaram uma óptica de 3mm, a 30 graus, usada em artroscopia. Obtiveram boa visibilização dos órgãos da cavidade peritoneal. A introdução de agulhas especiais e instrumentos delicados permitiram a realização dos procedimentos operatórios.

SCHILLING *et al.*, (1997), utilizaram o método do “*laser doppler*” para avaliar alterações da microcirculação de vários órgãos intra-abdominais quando a pressão era elevada de 10 para 15mmHg, por insuflação de CO<sub>2</sub>. Concluíram que a 15mmHg ocorria redução do fluxo sanguíneo em 54% no estômago, 32% no jejuno, 39% no cólon e em 60% no peritônio parietal, mesmo com a pressão arterial normal.

LINHARES JÚNIOR (1999), estudou a disseminação hematogênica de bactérias em ratos com peritonite bacteriana, submetidos à limpeza mecânica da cavidade peritoneal por laparotomia ou por videolaparoscopia, com pneumoperitônio a 4mmHg por CO<sub>2</sub> e concluiu que não houve diferença entre estas técnicas cirúrgicas, no que se refere à disseminação bacteriana por via hematogênica.

DIMBARRE (1999), também avaliou a influência do pneumoperitônio na população bacteriana intra-peritoneal e na ocorrência de bacteremia em ratos com peritonite fecal induzida, porém, com pressão intra-abdominal de 10mmHg. O autor comparou este procedimento de lavagem intra-abdominal ao procedimento padrão, a laparotomia. Concluiu

---

que em vigência de pneumoperitônio a 10mmHg, por uma hora, a lavagem intra-abdominal apresentou efeitos similares sobre a população bacteriana intra-abdominal que a laparotomia, porém, determinou níveis mais elevados de bacteremia que o procedimento padrão.

SALGADO JR *et al.*, (2001), aplicaram o modelo de peritonite bacteriana por ligadura e perfuração do ceco de ratos para avaliação do tratamento mediante acessos por laparotomia e videolaparoscopia. Após 6 horas de indução da peritonite, os animais foram submetidos aos tratamentos cirúrgicos propostos e avaliados com base na taxa de hemoculturas positivas e na taxa de mortalidade. O tratamento consistiu de tiflectomia seguida ou não de lavagem da cavidade peritoneal com solução fisiológica. Concluíram que o modelo experimental induz peritonite grave, e a bacteremia associada ao tratamento videolaparoscópico tem alta letalidade.

HAJAR, REPKA & CANAN JUNIOR (2002) investigaram a translocação bacteriana decorrente da ação do pneumoperitônio com CO<sub>2</sub> a 10mmHg por uma e três horas, em ratos normais e em ratos com colite induzida. Demonstraram que a ocorrência de translocação bacteriana nos diferentes órgãos independe do gênero da bactéria, e que não houve incremento da translocação bacteriana em relação a duração de pneumoperitônio, por uma ou três horas, tanto em ratos normais como nos submetidos a colite induzida. Concluíram que o pneumoperitônio induz a translocação bacteriana em ratos normais e a incrementa em ratos com colite ulcerativa.

CHIDA *et al.*, (2003) avaliaram respectivamente a função renal e a função hepática de ratos normotensos da linhagem EPM-1 Wistar e hipertensos da linhagem SHR (*Spontaneously Hypertensive Rats*), submetidos a baixa ou alta pressão de pneumoperitônio. Foram avaliadas as enzimas hepáticas AST, ALT, DHL e bilirrubinas. Com pneumoperitônio de 4mmHg a AST e ALT apresentaram níveis iniciais menores do que após insuflação e desinsuflação enquanto a DHL, a BT e a BD não se alteraram em ambas as linhagens. Na pressão de 10mmHg a AST e a DHL não se alteraram nos ratos normotensos e

---

---

aumentaram nos hipertensos, a BD não se alterou, a ALT e a BT aumentaram para ambas as linhagens. Concluíram que a função hepática mostrou-se alterada e a medida do tempo após a desinsuflação foi curta para evidenciar uma eventual reversão dessas alterações, tanto nos ratos normotensos quanto nos hipertensos.

FRANCO DE SOUZA (2003), avaliou em ratos a influência do pneumoperitônio por CO<sub>2</sub>, nas pressões de 12 e 15mmHg, com durações de uma e duas horas, sobre a dosagem de malondialdeído intestinal como indicador de estresse oxidativo. Após os períodos determinados de manutenção de pneumoperitônio, a cavidade abdominal foi desinflada por uma hora e a seguir foram coletadas amostras de segmentos intestinais para a dosagem de malondialdeído. Concluiu que ocorre estresse oxidativo e este se altera com correlação com a duração e com a pressão do pneumoperitônio.

ÖZGÜN *et al.*, (2004), investigaram os efeitos da elevação da pressão intra-abdominal na cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. Organizaram o estudo em três grupos iguais: grupo 1, controle onde procederam anastomose colônica e anestesia por 180 minutos. Grupo 2, 180 minutos de pneumoperitônio a 10mmHg e anastomose colônica; e grupo 3, semelhante ao grupo 2 porém foi executada colostomia proximal. Após sete dias de evolução avaliaram a pressão de ruptura, dosagem tecidual de hidroxiprolina e de óxido nítrico e parâmetros de inflamação tecidual no local das anastomoses. Concluíram que o pneumoperitônio a 10mmHg promovia atraso na maturação de colágeno e prejudicava a força anastomótica no cólon e que o desempenho de um *loop* de colostomia, elaborado para proteger a anastomose não altera a a força anastomótica no cólon.

SANTOS *et al.*, (2005), ao analisarem os efeitos morfológicos e funcionais do pneumoperitônio sobre o rim remanescente em ratos submetidos a nefrectomia unilateral, demonstraram que a função renal residual não evidenciou alteração de significância clínica em ratos submetidos a duas e quatro horas de pneumoperitônio após o período de oito semanas. A análise morfológica do rim remanescente não revelou alteração histológica sugestiva de dano renal. Concluíram que a função e a morfologia renais de ratos

---

---

submetidos a nefrectomia unilateral, não são significativamente influenciadas por prolongadas e sucessivas induções de pneumoperitônios.

BOTTER *et al.*, (2005), estudaram as alterações hemodinâmicas e respiratórias em ratos submetidos ou não ao pneumoperitônio por CO<sub>2</sub>, sob anestesia com ou sem intubação intratraqueal. O estudo foi organizado em quatro grupos: GA - anestesia com intubação endotraqueal por uma hora e com pneumoperitônio de 4mmHg de CO<sub>2</sub>; GB - anestesia sem intubação endotraqueal por uma hora e com pneumoperitônio de 4mmHg de CO<sub>2</sub>; GC - anestesia sem intubação endotraqueal por uma hora e sem pneumoperitônio; GD - anestesia com intubação endotraqueal por uma hora, sem pneumoperitônio. Concluíram que a anestesia geral com intubação endotraqueal associada ao pneumoperitônio de 4mmHg, por um período de uma hora, mostrou vantagens do ponto de vista respiratório e hemodinâmico, em relação aos animais com pneumoperitônio e sem intubação e também sobre aqueles com até quatro horas de anestesia, apesar da intubação

ARAÚJO FILHO *et al.*, (2006), investigaram se o pneumoperitônio a 3 mmHg por 30 minutos com CO<sub>2</sub> altera a expressão das citocinas, a gasometria e a contagem diferencial de leucócitos em ratos com sepse abdominal. Utilizaram ratos Wistar aleatoriamente distribuídos em 5 grupos: controle (somente anestesia), laparotomia, pneumoperitônio com CO<sub>2</sub>, ligadura e punção do ceco por laparotomia, ligadura e punção do ceco por laparoscopia. Após 30 minutos dos procedimentos foi colhido sangue arterial para avaliação da leucometria diferencial e líquido intraperitoneal para as dosagens de TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6. Os parâmetros gasosos foram medidos no sangue arterial e nos exsudatos intraperitoneal e subperitoneal. Este autores demonstraram que o pneumoperitônio com CO<sub>2</sub> contribuiu para a redução da resposta inflamatória em ratos submetidos a modelo de sepse abdominal, no que diz respeito à expressão de citocinas intraperitoneais e leucometria diferencial. O pneumoperitônio também contribuiu para instalação de acidose hipercárbica nos ratos sépticos.

---

CREMA *et al.*, (2008), avaliaram o efeito da ação analgésica do pneumoperitônio em animais submetidos à irritação peritoneal provocada pelo zymosan, mediante a contagem do número de contrações abdominais. Para o estudo utilizaram 60 camundongos separados em dois grupos, grupo experimento (com pneumoperitônio) e controle (sem pneumoperitônio). Ambos os grupos receberam injeção intraperitoneal de zimosan na dose de 1mg/0,2ml/camundongo. Observaram que o somatório do número de contrações abdominais do grupo experimento foi significativamente menor que no grupo controle. Estes autores aventaram através deste estudo o efeito analgésico do pneumoperitônio com CO<sub>2</sub> em animais submetidos à irritação peritoneal pelo zimosan.

PITOMBO *et al.*,(2008), analisaram a disseminação de bactérias marcadas com tecnécio-99m (<sup>99m</sup>Tc) a partir da cavidade peritoneal após diferentes procedimentos cirúrgicos. Utilizaram *Escherichia coli* marcadas com <sup>99m</sup>Tc na concentração de 10<sup>8</sup> UFC/ml inoculadas por via intra-peritoneal. Quarenta e oito ratos foram separados em quatro grupos: controle, laparotomia, pneumoperitônio com 10mmHg e pneumoperitônio com 20 mmHg de CO<sub>2</sub>. Os procedimentos foram realizados 20 minutos após a injeção do inóculo e duraram 30 minutos. Os animais foram sacrificados após seis horas (grupo pneumoperitônio com 10mmHg) e 24 horas (grupo pneumoperitônio com 20 mmHg de CO<sub>2</sub>). Foram coletadas amostras de sangue, fígado e baço para contagem radioativa. Após seis horas, a detecção indireta das bactérias nos diferentes órgãos foi uniforme em todos os grupos. Após 24 horas, observou-se maior detecção nos fígados dos animais do grupo insuflado com 20 mmHg de CO<sub>2</sub>, quando comparados aos do grupo controle (p<0,01). Os outros grupos não apresentaram variações estatisticamente significativas. Concluíram que a utilização de pressões intra-abdominais mais elevadas associou-se à maior disseminação bacteriana para o fígado. A utilização de pressões intra-abdominais menos elevadas na abordagem da peritonite pode estar associada à menor disseminação do quadro infeccioso.

### ***3 Material e Método***

---



### 3.1 DESCRIÇÃO DA AMOSTRA E ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Utilizaram-se 32 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, com idades entre 120 a 140 dias e pesos de  $265,34 \pm 23,73$  gramas, provenientes do biotério do Instituto de Tecnologia do Paraná. Os animais foram separados em grupos conforme descrito no quadro 1:

**QUADRO 1 - DEMONSTRATIVO DA ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DE ANIMAIS**

Grupos	Sub-grupos	Procedimentos	N
Controles	(C-PP) Controle do Pneumoperitônio	Submetidos à indução de pneumoperitônio por uma hora a 10 mmHg e mantidos por seis horas até a coleta de amostras	8
	(C-LPS <sub>4</sub> ) Controle da inoculação de LPS por 4 horas	Submetidos à inoculação de 10mg/kg de LPS e mantidos por 4 horas até a coleta de amostras	8
	(C-LPS <sub>11</sub> ) Controle da inoculação de LPS por 11 horas	Submetidos à inoculação de 10mg/kg de LPS e mantidos por 11 horas até a coleta de amostras	8
Experimento (E)	Submetidos à inoculação de 10mg/kg de LPS e mantidos por quatro horas, a seguir indução de pneumoperitônio por uma hora a 10 mmHg e mantidos por seis horas até a coleta de amostras.		8

Legenda:

- N= número de ratos
- LPS= Lipopolissacarídeo ou endotoxina bacteriana

Os ratos foram mantidos em grupos de quatro, em caixas de polipropileno, adequadas para a espécie, substituídas a cada 48 horas, devidamente identificadas e cada animal também identificado com marcas permanentes feitas na pelagem, com solução de ácido pícrico comercial. Foram mantidos em ambiente específico, com temperatura e umidade controladas sob ciclos de iluminação automaticamente regulados a cada 12 horas. Receberam de forma *ad libitum*, água e ração específica para a espécie (NUVILAB, NUVITAL<sup>®</sup>) e água.

Foram separados em dois grupos, grupo controle e grupo experimento. O grupo experimento (E) foi submetido à inoculação de LPS e mantidos por quatro horas, seguido de indução do pneumoperitônio por uma hora e posteriormente mantidos por seis horas até a

colata de amostras. Com base nas fases anteriores do grupo experimento, foram elaborados os controles: inoculação de LPS e manutenção por quatro horas e coleta de amostras (C-LPS<sub>4</sub>), indução de pneumoperitônio e coleta de amostras (C-PP) e ainda inoculação de LPS e manutenção por onze horas e coleta de amostras (C-LPS<sub>11</sub>).

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Experimental do Hospital e Maternidade Angelina Caron, conforme parecer demonstrado no anexo 1.

### 3.2 NORMAS APLICADAS

Neste estudo foram observadas as seguintes normatizações: Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), Lei Federal nº6.638 (1979)<sup>2</sup>, Orientações sobre Calibração e Rastreabilidade das Medições em Laboratórios (INMETRO, DOQ-DIMCI-003.1999) e as Normas para Apresentação de Trabalhos da Universidade Federal do Paraná (2007) e a Nomina Anatômica de Walker (WALKER & HOMBERGER, 1997).

### 3.3 INDUÇÃO DE PNEUMOPERITÔNIO

Seguiu-se a metodologia descrita por HAJAR, REPKA e CANAN JUNIOR (2002), e validada por FRANCO DE SOUZA (2003), conforme as seguintes etapas:

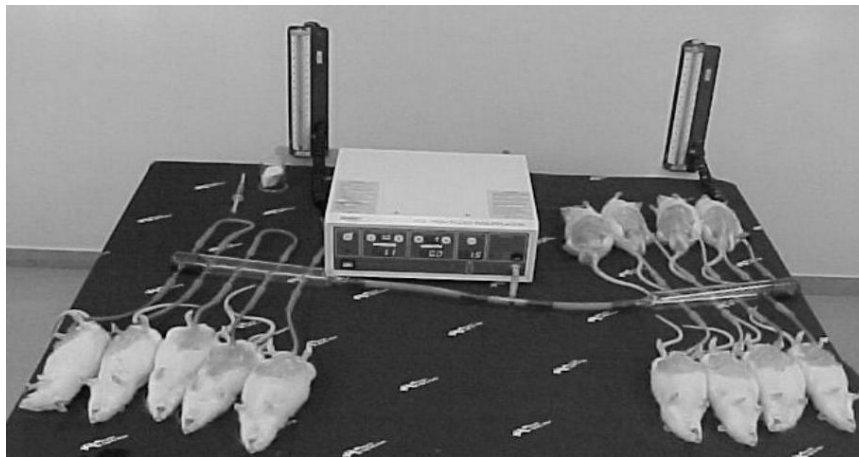
- Os ratos foram submetidos ao jejum nas 24 horas prévias ao experimento;

---

<sup>2</sup> *BRASIL, Lei Federal nº6638 de 08 de maio de 1979*. Estabelece normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais e determina outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, p.1, 10 de maio de 1979.

---

- Pesagem e anestesia dos animais pela administração de 100mg/kg Cetamina (Cristalia<sup>®</sup>) associado a 10mg/kg Xilasina (Dopaser, Calier<sup>®</sup>) por via intramuscular (panturrilha), de acordo com a metodologia proposta por BACELAR (1999);
- Os animais anestesiados foram colocados em decúbito dorsal e realizada anti-sepsia abdominal com álcool iodado e em seguida foram puncionados na região mediana infra-umbilical do abdômen, com agulha 40X12mm;
- A agulha foi conectada através de tubo de silicone esterilizado ao dispositivo distribuidor de CO<sub>2</sub> e este, ao insuflador eletrônico (ENDOVIEW<sup>®</sup>);
- O aparelho de insuflação foi regulado a 100ml/minuto de CO<sub>2</sub>, por uma hora. Os ratos foram mantidos em temperatura ambiente regulada entre 19 a 22°C e respiração espontânea.



**FIGURA 2 - Indução de pneumoperitônio em 13 ratos simultaneamente**

- Ao término o insuflador foi desligado e provocada a desinsuflação abdominal dos ratos por leve compressão manual;
- Durante este período foi verificada clinicamente a ocorrência de sinais de hipotermia, indicada por pilo-ereção e tremores, bem como de baixa perfusão de oxigênio indicada pela cor da pele das orelhas e patas, conforme descrito por BACELAR (1999).

---

## 3.4 INDUÇÃO DE ENDOTOXEMIA PELO LPS

### 3.4.1 Preparação do inóculo de lipopolissacarídeo (LPS)

Seguiu-se a metodologia proposta por FINK (2001) e MATSUMOTO *et al.*, (2001), sendo que a solução foi preparada imediatamente antes de sua inoculação.

### 3.4.2 Material

- LPS Sigma Chemical<sup>®</sup> (artigo L-4130 lote 30k4063) liofilizado, obtido da cepa 0111:B4 de *Escherichia coli*;
- Balança de precisão (Mettler<sup>®</sup>);
- Solução fisiológica (0,9% NaCl) esterilizada e apirogênica (Frezenius<sup>®</sup>);
- Frascos de vidro esterilizados e despirogenizados;

### 3.4.3 Método

- Pesar 5mg de LPS em frascos de vidro esterilizado e apirogênico e solubilizar em 10ml de solução fisiológica, imediatamente antes de sua inoculação nos ratos;

### 3.4.4 Inoculação

- Pesar os ratos, anotar o peso em protocolo e proceder aos cálculos para a dose de 10mg/kg de peso;
  - Verificar a identificação da caixa e de cada rato;
  - Sedar rapidamente os ratos em campânula fechada sob saturação de Isoflurano (Forane<sup>®</sup> Abbott) tomando a precaução de não induzir anestesia;
-

- 
- Inocular o volume calculado da solução de LPS com seringa descartável de 0,5ml com agulha fixa de 12,7mm x 0,33mm (Beckton Dickinson®), por via intraperitoneal;
  - Devolver os ratos inoculados para caixa limpa e observá-los por 30 minutos;
  - Os mesmos procedimentos foram feitos nos ratos do sub-grupo controle do pneumoperitônio, sendo inoculado solução fisiológica em volume proporcional ao peso;

### 3.5 AFERIÇÕES

#### 3.5.1. Coleta de sangue

Os ratos eram anestesiados em campânula fechada sob saturação de isoflurano (Forane® Abbott). Seguiram-se as seguintes etapas :

- Degermar a pele da região torácica com álcool iodado.
  - Puncionar o tórax do animal na posição em que se perceba os batimentos cardíacos, com seringa de 20 ml e agulha 25x8mm (Beckton-Dikinson) esterilizadas e apirogênicas;
  - Aspirar sangue até o volume mínimo de 10ml, suficiente para a indução de parada cárdio-respiratória;
  - Imediatamente substituíam-se as agulhas e o sangue foi separado em alíquotas mínimas de 2ml em quatro diferentes tubos de ensaio para as seguintes aferições:
    - Tubos de ensaio contendo anti-coagulante (EDTA) para avaliações hematológicas: contagem de leucócitos, bastonetes e plaquetas, que foram procedidas num prazo máximo de 2 horas após a coleta das amostras;
    - Tubo sem anticoagulante para avaliações de: bilirrubina direta, bilirrubina total, TGO, TGP uréia e creatinina. Estes tubos foram submetidos à centrifugação após a
-

---

coagulação do sangue e separado o soro. As dosagens foram procedidas num prazo máximo de 2 horas após a coleta das amostras;

- Tubo sem anticoagulante esterilizados e apirogênicos para as dosagens de endotoxina, fator de necrose tumoral alfa e interleucina 6. Estes tubos foram submetidos à centrifugação após a coagulação do sangue e separado o soro. Os soros foram transferidos para frascos esterilizados e apirogênicos e mantidos na temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$  até a oportunidade de seus processamentos laboratoriais, tendo como prazo máximo de 20 dias.
- Tubo contendo anticoagulante (citrato de sódio a 3,2%) para determinação do tempo de ação da protrombina (TAP).

### 3.5.2 Dosagem do fator de necrose tumoral alfa

Para a dosagem de  $\text{TNF}\alpha$  seguiram-se as orientações de SPRONG *et al.*, (1997), na qual um anticorpo monoclonal específico anti- $\text{TNF}\alpha$  é fixado em placa de Terazaki para posterior captura do antígeno ( $\text{TNF}\alpha$ ).

Foi empregado o conjunto de reativos BIOTRA – Tumor Necrosis Factor ELISA System (AMERSHAM PHARMACIA code RPN 2718<sup>®</sup>).

As amostras de plasma foram distribuídas em cada um dos orifícios da placa, em volumes de 50  $\mu\text{l}$ , em duplicatas e a seguir eram incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  por 2 horas e submetidas à revelação com anticorpos monoclonais anti- $\text{TNF}\alpha$  conjugados com peroxidase, os quais reagindo com peróxido de hidrogênio, desenvolvem cor mensurável em espectrofotômetro a 450nm de comprimento de onda. O desenvolvimento da cor indica a presença do  $\text{TNF}\alpha$  na amostra, que será diretamente proporcional à leitura espectrofotométrica.

---

**3.5.2.1 Materiais :**

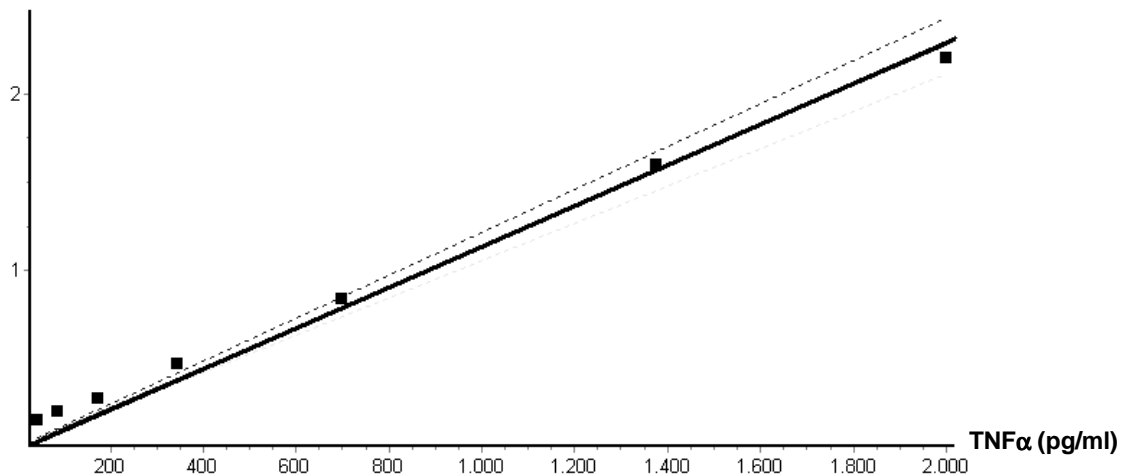
- Placa de Terazaki sensibilizada com anticorpos monoclonais anti-TNF $\alpha$  de rato.
- Padrão de TNF $\alpha$  de rato
- Anticorpos monoclonais anti-TNF $\alpha$  de rato, conjugado à peroxidase
- Peróxido de Hidrogênio a 30%
- Solução de Ácido Sulfúrico 10N.
- Solução tampão fosfatos pH 7,5
- Solução tampão citrato pH 5,0

**3.5.2.2 Método :**

- Distribuir 50 $\mu$ l da amostra em cada orifício da placa de Terazaki.
  - Distribuir 50 $\mu$ l de cada diluição do TNF $\alpha$  padrão que contenham : 5,37pg/ml, 10,75pg/ml, 21,5pg/ml, 43pg/ml, 86pg/ml, 172pg/ml, 344pg/ml, 697pg/ml, 1.375pg/ml e 2.000pg/ml.
  - Incubar por 2 horas à temperatura ambiente.
  - Esvaziar o conteúdo da placa por inversão e lavar três vezes com tampão fosfatos pH7,5.
  - Distribuir 100 $\mu$ l do conjugado diluído a 1/3.000 (anticorpo monoclonal anti- TNF $\alpha$  conjugado à peroxidase), em cada um dos orifícios.
  - Incubar 1 hora à temperatura ambiente.
  - Esvaziar o conteúdo da placa por inversão e lavar três vezes com tampão fosfatos pH7,5.
  - Distribuir 20 $\mu$ l de peróxido de hidrogênio a 30%, em cada um dos orifícios.
-

- Distribuir 10 $\mu$ l de Ortofenilenediamino (50mg em 25ml de tampão Citrato pH5,0) e incubar por 15 minutos.
- Adicionar em cada orifício 10 $\mu$ l de ácido sulfúrico 10N
- Ler a absorbância do conteúdo de cada orifício em espectrofotômetro a 450nm.
- Calcular por regressão linear a quantidade de TNF $\alpha$  presente nas amostras em picogramas/ml, por interpolação das leituras obtidas nas amostras com as leituras do padrão de TNF $\alpha$  de rato (gráfico 1 - coeficiente de regressão linear de 0,93125).

**GRÁFICO 1 - Representação gráfica da calibração do padrão de TNF $\alpha$  em densidade óptica de 450nm.**



### 3.5.3 Dosagem de interleucina 6

Para a dosagem de IL6 seguiram-se as orientações de BAZAN (1993), na qual um anticorpo monoclonal específico anti-IL6 é fixado em placa de Terazaki para posterior captura do antígeno (IL6).

Foi empregado o conjunto de reativos ABAZYME HUMAN IL6 ELISA KIT<sup>®</sup> EL-10023).

As amostras de plasma foram distribuídas em cada um dos orifícios da placa, em volumes de 100  $\mu$ l, em duplicatas e a seguir eram incubadas a 37°C por 2 horas e submetidas à revelação com anticorpos monoclonais anti-IL6 conjugados com biotina, os



---

quais reagindo com avidina, desenvolvem cor mensurável em espectrofotômetro a 450nm de comprimento de onda. O desenvolvimento da cor indica a presença do IL6 na amostra, que será diretamente proporcional à leitura espectrofotométrica.

#### **3.5.3.1 Materiais :**

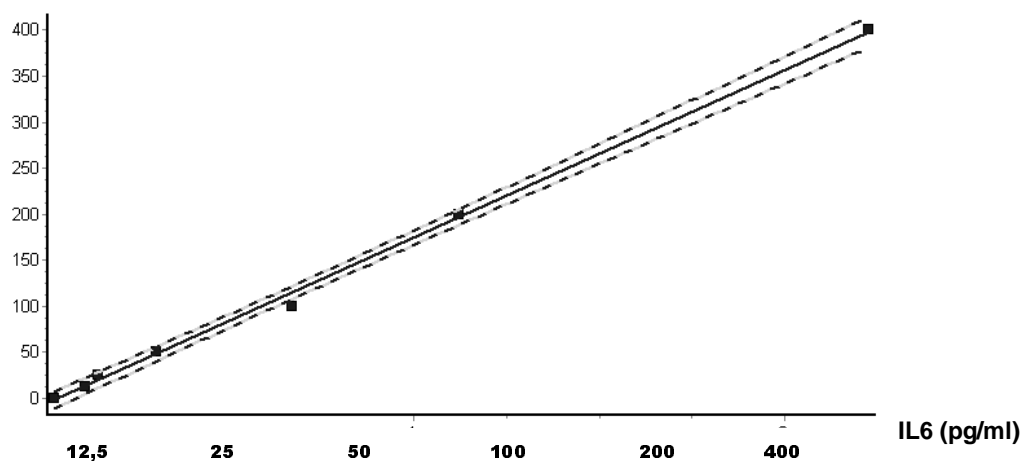
- Placa de Terazaki sensibilizada com anticorpos monoclonais anti- IL6.
- Padrão de IL6
- Anticorpos monoclonais anti- IL6, conjugado à biotina
- Avidina conjugada ao Peróxido de Hidrogênio a 30%
- Ortofenileno diamino
- Solução de Ácido Sulfúrico 10N.
- Solução tampão fosfatos pH 7,5
- Solução tampão citrato pH 5,0

#### **3.5.3.2 Método :**

- Distribuir 100µl a amostra em cada orifício da placa de Terazaki.
  - Distribuir 100µl de cada diluição da IL6 padrão que contenham : 6,25pg/ml, 12,5pg/ml, 25pg/ml, 50pg/ml, 100pg/ml, 200pg/ml e 400pg/ml.
  - Incubar por 2 horas à temperatura ambiente.
  - Esvaziar o conteúdo da placa por inversão e lavar três vezes com tampão fosfatos pH7,5.
  - Distribuir 100µl do conjugado diluído a 1/3.000 (anticorpo monoclonal anti- IL6 conjugado à avidina-peroxidase), em cada um dos orifícios.
-

- Incubar 1 hora à temperatura ambiente.
- Esvaziar o conteúdo da placa por inversão e lavar três vezes com tampão fosfatos pH7,5.
- Distribuir 20µl de peróxido de hidrogênio a 30%, em cada um dos orifícios.
- Distribuir 10µl de Ortofenilenediamino (50mg em 25ml de tampão Citrato pH5,0) e incubar por 15 minutos.
- Adicionar em cada orifício 10µl de ácido sulfúrico 10N
- Ler a absorbância do conteúdo de cada orifício em espectrofotômetro a 450nm.
- Interpolar as leituras dos padrões de IL6 de rato às leituras das amostras.
- Calcular por regressão linear a quantidade de IL6 presente nas amostras em picogramas/ml, com coeficiente de regressão linear (r) de 0,99568.

**GRÁFICO 2 - Representação gráfica da calibração do padrão de IL6 em densidade óptica de 450nm.**



#### 3.5.4. Dosagem de Endotoxina – LPS

Para a dosagem de endotoxinas, foi empregado o método do *Limulus Amebocyte Lisate* (ENDOSAFE® 1073), descrito por BERTÓK (1997), que tem por princípio a capacidade dos amebócitos extraídos do crustáceo *Limulus polyphemus* gelificarem-se na presença de endotoxinas (LPS). Esta gelificação é consequência da ativação da enzima

---

zimogênica serin-protease, em presença de cátions divalentes que produzem o coagulogênio do *Limulus*.

#### 3.5.4.1 Material

- Reagente LAL (Lisado de Amebócitos de *Limulus* sp.);
- Endotoxina padrão de *Escherichia coli* (50UE/ml);
- Tubos de vidro despirogenizados para hemólise
- Frascos de 20ml despirogenizados
- Pipetas de vidro 2,0; 5,0 e 10ml;
- Agitador de tubos;
- Banho-Maria regulado a 37°C
- Pipetas automáticas Gilson® com ponteiros apirogênicos.

#### 3.5.4.2 MÉTODO

##### ***Preparação de Materiais Despirogenizados***

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

##### ***Preparação do Reagente LAL***

- O lisado foi reconstituído com água apirogênica no volume indicado pelo fabricante do reagente.
  - Homogenizou-se evitando a formação de espuma. Aliquotou-se, o lisado, com pipeta automática: 0,1ml do reagente LAL em tubos de hemólise. Os tubos foram conservados em freezer a -20°C.
-

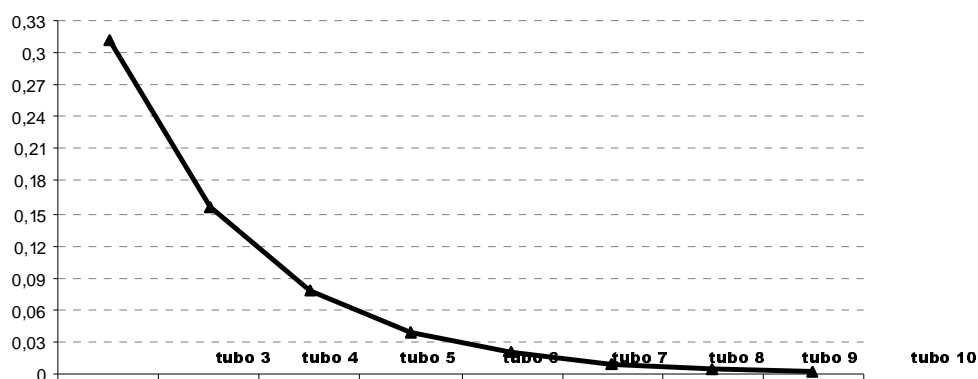
### Preparação da Endotoxina Padrão

- O liofilizado de endotoxina padrão foi reconstituído com água e materiais despirogenizados, conforme as orientações do fabricante. A solução padrão de endotoxina continha 50UE/ml.
- *Preparação da Curva Padrão de Endotoxina*
- **Foram preparadas diluições do padrão de endotoxina conforme a tabela abaixo :**

Tabela 1 - Diluições da Endotoxina Padrão

Tubo	Volume a ser transferido (ml)	Água Apirogênica	Unidades Endotóxicas (UE/ml)	Resultado
1	0,5ml de endotoxina padrão (50 UE/ml)	4,5ml	2,5	Positivo
2	0,5ml do tubo 1	0,5ml	1,25	Positivo
3	0,5ml do tubo 2	0,5ml	0,3125	Positivo
4	0,5ml do tubo 3	0,5ml	0,15625	Positivo
5	0,5ml do tubo 4	0,5ml	0,078125	Positivo
6	0,5ml do tubo 5	0,5ml	0,0390625	Positivo
7	0,5ml do tubo 6	0,5ml	0,01953125	Positivo
8	0,5ml do tubo 7	0,5ml	0,00976562	Negativo
9	0,5ml do tubo 8	0,5ml	0,00488281	Negativo
10	0,5ml do tubo 9	0,5ml	0,00244140	Negativo

GRÁFICO 3 - Representação gráfica das diluições da endotoxina padrão em unidades endotóxicas/ml (UE/ML)



- A cada diluição realizada, o tubo foi agitado em vórtex, durante 5 minutos e após distribuído 0,1ml de cada uma das diluições nos tubos com o reagente LAL.

- 
- Incubou-se por 1 hora em “banho-Maria” 37°C. A leitura foi realizada com a inversão dos tubos a 180°C. O resultado positivo foi indicado pela formação de gel que não se desprendia do fundo do tubo.
  - A sensibilidade do reagente LAL, foi acertada como a última diluição com reação de gelificação positiva = 0,01953125UE/ml.
  - Distribuiu-se 0,1ml da amostra em tubo contendo o reagente LAL. Realizou-se a prova com controle positivo (endotoxina padrão 5 UE/ml) e controle negativo (água apirogênica).
  - Foi incubado a 37°C por 1 hora e após realizou-se a leitura. Se a amostra produzisse reação de gelificação, procedia-se à análise quantitativa, conforme descrito abaixo:
  - Realizaram-se diluições seriadas do plasma, com fator 2 de diluição 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1/32, em água apirogênica.
  - Distribuiu-se 0,1ml de cada diluição em tubos contendo 0,1ml do reagente LAL e incubou-se a 37°C por 1 hora e realizou-se a leitura.
  - Se a amostra produzir reação de gelificação, proceder ao cálculo de teor de endotoxina em unidades endotóxicas por mililitro de plasma, multiplicando a sensibilidade do reagente LAL (0,01953125UE) pela última diluição que produziu reação de gelificação.

### **3.5.5 Avaliações Bioquímicas e Hematológicas**

#### **3.5.5.1 Dosagens de Bilirrubinas e Transaminases**

Método automatizado com reativos específicos e padrões para cada teste Selectra II (Vitalab®).

#### **3.5.5.2 Dosagens de Uréia e Creatinina**

Método automatizado com reativos específicos e padrões para cada teste Selectra II (Vitalab®).

---

### **3.5.5.3 Contagem de Leucócitos e Plaquetas**

Método automatizado com reativos específicos SELDIN 3000®.

### **3.5.5.4 Contagem de Bastonetes**

As contagens foram feitas pelo método microscópico porcentual, em distensões hematológicas de cada amostra coradas pelo método de May-Grunwald Giemsa.

### **3.5.5.5 Avaliação do Tempo de Ação da Protrombina**

Método automatizado com reativos específicos STAGO BAYE®

## **3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados foram comparados mediante a análise estatística pelo método de T de Student e adotado 0,05 como nível de rejeição da hipótese nula. Utilizou-se o programa GRAPHPAD SOFTWARE.

---

## ***4 Resultados***

---

#### 4.1 MORTALIDADE E SOBREVIVÊNCIA

Não ocorreu mortalidade entre os animais submetidos ao pneumoperitônio ou às inoculações de LPS.

#### 4.2 PROVAS DE FUNÇÃO RENAL

As dosagens de creatinina foram analisadas por comparação dos valores de referência às médias dos grupos. No gráfico 4 observa-se que o grupo E apresentou maiores valores ( $0,85 \pm 0,24$  mg/dl), diferindo significativamente (tabela 2) dos grupos referência ( $0,63 \pm 0,13$  mg/dl) com  $p=0,0013$  e do grupo C-PP ( $0,57 \pm 0,1$  mg/dl) com  $p=0,0114$ .

As dosagens de uréia dos grupos E, C-LPS4, C-LPS11 e C-PP foram significativamente maiores (tabela 3) que as médias de referência. No gráfico 5 observa-se que o grupo E apresentou maiores valores ( $106,38 \pm 37,61$  mg/dl), diferindo significativamente (tabela 3) dos valores de referência ( $36,41 \pm 7,17$  mg/dl) com  $p < 0,0000$ , e dos grupos C-PP ( $43,75 \pm 11,44$  mg/dl) com  $p=0,0158$ , C-LPS4 ( $65,25 \pm 19,51$  mg/dl) com  $p=0,0158$  e não diferiu do grupo C-LPS11 ( $111,88 \pm 62,28$  mg/dl) com  $p=0,8338$ .

##### 4.2.1 Dosagens de Creatinina

GRÁFICO 4 - Representação gráfica das médias e desvios-padrão das dosagens de creatinina.

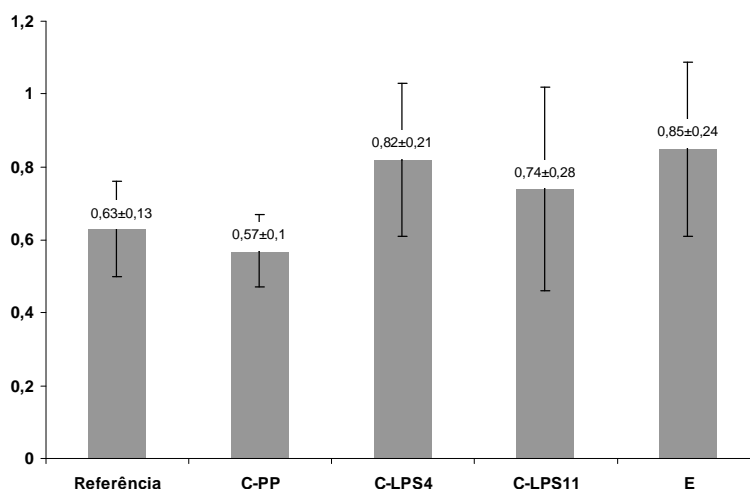




TABELA 2 – Demonstrativo das comparações estatísticas entre as dosagens de creatinina .

Grupo		Grupo	Valor de p
Referência	X	C-PP	0,2123
	X	<b>C-LPS4</b>	<b>0,0029</b>
	X	C-LPS11	0,1357
	X	<b>E</b>	<b>0,0013</b>
C-PP	X	<b>C-LPS4</b>	<b>0,0106</b>
	X	C-LPS11	0,1547
	X	<b>E</b>	<b>0,0114</b>
C-LPS4	X	C-LPS11	0,5308
	X	E	0,7938
C-LPS11	X	E	0,4192

#### 4.2.2 Dosagens de Uréia

GRÁFICO 5 - Representação gráfica das médias e desvios-padrão das dosagens de uréia.

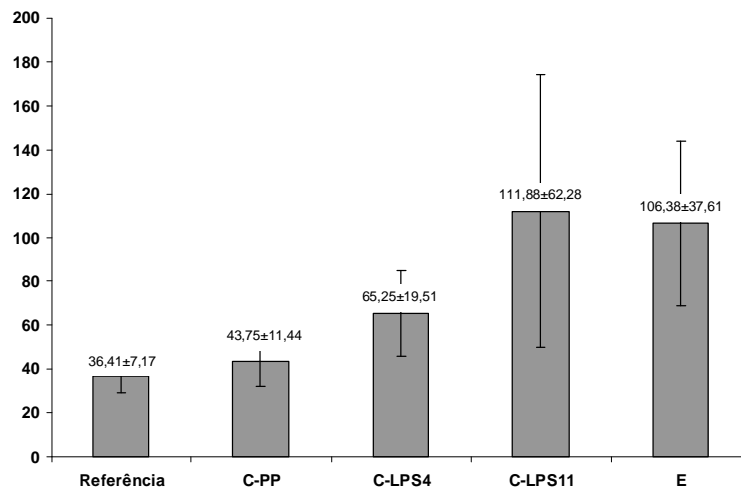


TABELA 3 – Demonstrativo das comparações estatísticas entre as dosagens de uréia .

Grupo		Grupo	Valor de p
Referência	X	C-PP	<b>0,0000</b>
	X	<b>C-LPS4</b>	<b>0,0000</b>
	X	<b>C-LPS11</b>	<b>0,0000</b>
	X	<b>E</b>	<b>0,0000</b>
C-PP	X	C-LPS4	1,0000
	X	C-LPS11	0,0629
	X	<b>E</b>	<b>0,0158</b>
C-LPS4	X	C-LPS11	0,0629
	X	<b>E</b>	<b>0,0158</b>
C-LPS11	X	E	0,8338

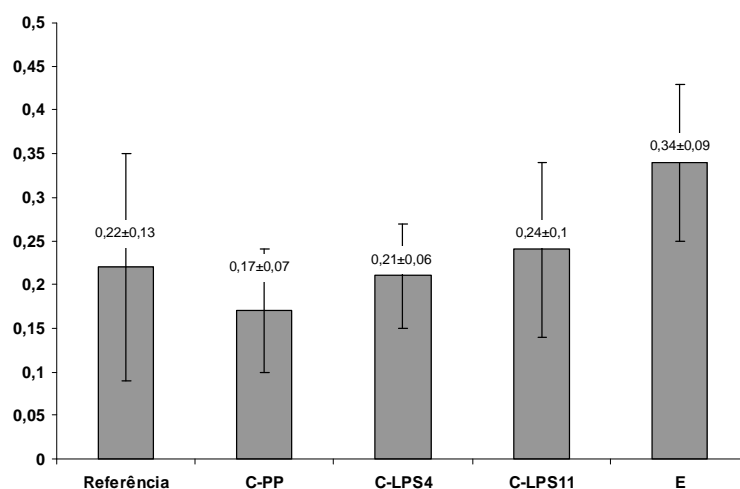
### 4.3 PROVAS DE FUNÇÃO HEPÁTICA

As dosagens de bilirrubina direta foram analisadas por comparação dos valores de referência às médias dos grupos. No gráfico 6 observa-se que o grupo E apresentou maiores valores ( $0,34 \pm 0,09$  mg/dl), diferindo significativamente (tabela 4) do grupo C-LPS4 ( $0,21 \pm 0,06$  mg/dl) com  $p=0,0039$ , do grupo C-LPS11 ( $0,24 \pm 0,1$  mg/dl) com  $p=0,0483$  e do grupo C-PP ( $0,17 \pm 0,07$  mg/dl) com  $p=0,0007$  e não diferiu dos valores de referência ( $0,22 \pm 0,13$  mg/dl) com  $p=0,7724$ .

As dosagens de bilirrubina total foram analisadas por comparação dos valores de referência às médias dos grupos. No gráfico 7 observa-se que o grupo E ( $0,48 \pm 0,16$  mg/dl) não diferiu significativamente (tabela 5) dos demais grupos.

#### 4.3.1 Dosagens de Bilirrubina Direta

**GRÁFICO 6 - Representação gráfica das médias e desvios-padrão das dosagens de bilirrubina direta.**

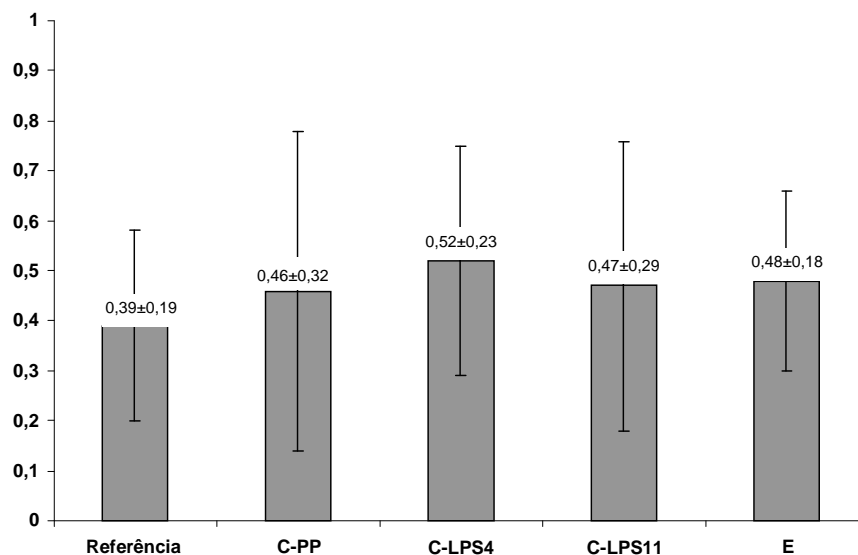


**TABELA 4 – Demonstrativo das comparações estatísticas entre as dosagens de bilirrubina direta .**

Grupo		Grupo	Valor de p	
Referência	X	C-PP	0,2805	0,2805
	X	C-LPS4	0,7532	0,7532
	X	C-LPS11	0,7724	0,7724
	X	E	<b>0,0198</b>	0,7724
C-PP	X	C-LPS4	0,2844	0,2844
	X	C-LPS11	0,1513	0,1513
	X	E	<b>0,0007</b>	<b>0,0007</b>
C-LPS4	X	C-LPS11	0,5059	0,5059
	X	E	<b>0,0039</b>	<b>0,0039</b>
C-LPS11	X	E	<b>0,0483</b>	<b>0,0483</b>

#### 4.3.2 Dosagens de Bilirrubina Total

**GRÁFICO 7 - Representação gráfica das médias e desvios-padrão das dosagens de bilirrubina total.**



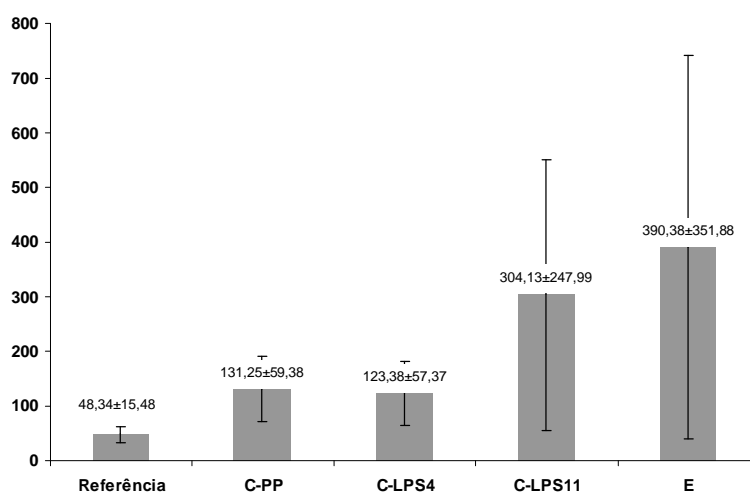
**TABELA 5 – Demonstrativo das comparações estatísticas entre as dosagens de bilirrubina total .**

Grupo		Grupo	Valor de p
Referência	X	C-PP	0,3871
	X	C-LPS4	0,0982
	X	C-LPS11	0,3012
	X	E	0,3012
C-PP	X	C-LPS4	0,6929
	X	C-LPS11	0,9419
	X	E	0,9018
C-LPS4	X	C-LPS11	0,7340
	X	E	0,7030
C-LPS11	X	E	0,9670

### 4.3.3 Dosagens de Alanina Aminotransferase

As dosagens de ALT dos grupos E, C-LPS4, C-LPS11 e C-PP foram significativamente maiores (tabela 6) que os valores de referência. No gráfico 8 observa-se que o grupo E apresentou maiores valores ( $390,38 \pm 351,88$  mg/dl), diferindo significativamente (tabela 6) do grupo C-LPS4 ( $123,38 \pm 57,37$  mg/dl) com  $p=0,0022$  e dos valores de referência ( $48,34 \pm 15,48$  mg/dl) com  $p<0,0000$ .

**GRÁFICO 8 - Representação gráfica das médias e desvios-padrão das dosagens de alanina aminotransferase (ALT).**



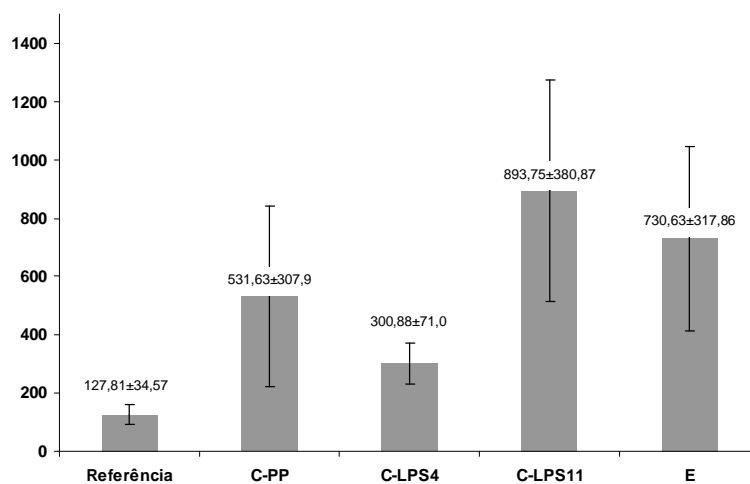
**TABELA 6 – Demonstrativo das comparações estatísticas entre as dosagens de alanina aminotransferase .**

Grupo		Grupo	Valor de p
Referência	X	C-PP	<b>0,0000</b>
	X	C-LPS4	<b>0,0000</b>
	X	C-LPS11	<b>0,0000</b>
	X	E	<b>0,0000</b>
C-PP	X	C-LPS4	0,0579
	X	C-LPS11	0,0552
	X	E	0,2241
C-LPS4	X	C-LPS11	<b>0,0007</b>
	X	E	<b>0,0022</b>
C-LPS11	X	E	0,3681

#### 4.3.4 Dosagens de Aspartato Aminotransferase

Conforme demonstrado no gráfico 9, as dosagens de AST dos grupos E, C-LPS4, C-LPS11 e C-PP foram significativamente maiores (tabela 7) que as médias de referência.

**GRÁFICO 9 - Representação gráfica das médias e desvios-padrão das dosagens de aspartato aminotransferase (AST).**



**TABELA 7 – Demonstrativo das comparações estatísticas entre as dosagens de aspartato aminotransferase .**

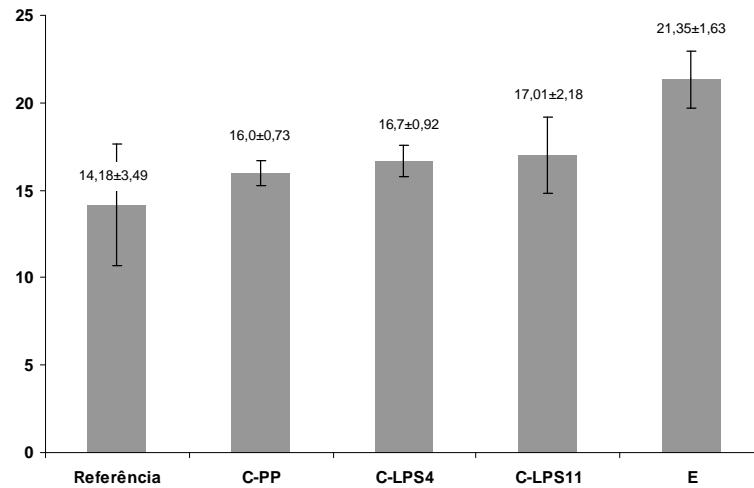
Grupo		Grupo	Valor de p
Referência	X	C-PP	<b>0,0000</b>
	X	C-LPS4	<b>0,0000</b>
	X	C-LPS11	<b>0,0000</b>
	X	E	<b>0,0000</b>
C-PP	X	C-LPS4	0,7913
	X	C-LPS11	0,0758
	X	E	0,0592
C-LPS4	X	C-LPS11	0,0643
	X	E	0,0525
C-LPS11	X	E	0,5799

#### 4.3.5 Determinação do Tempo de Ação da Protrombina

Conforme demonstrado no gráfico 10, o TAP do grupo E foi significativamente maior que dos demais grupos e dos valores de referência (tabela 8).

O grupo C-LPS11 ( $17,01 \pm 2,18$ ) também foi significante maior que os valores de referência ( $14,18 \pm 3,49$ ) com  $p=0,0355$  (tabela 8).

**GRÁFICO 10 - Representação gráfica das médias e desvios-padrão das determinações do tempo de ação da protrombina em segundos (TAP).**



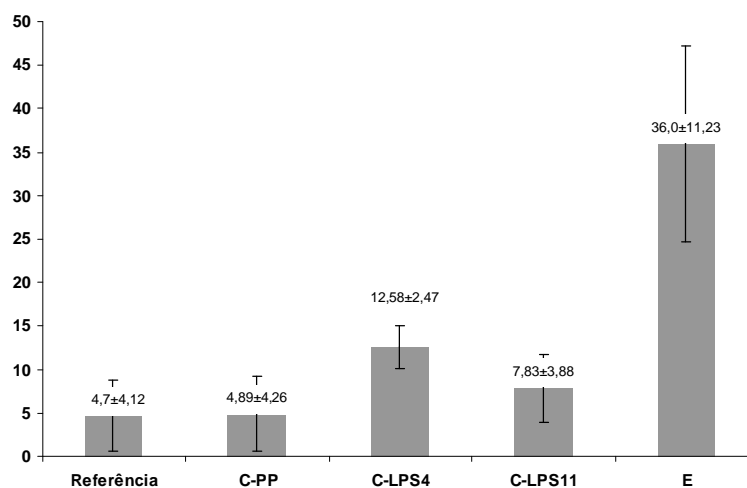
**TABELA 8 – Demonstrativo das comparações estatísticas entre as determinações do tempo de ação da protrombina .**

Grupo		Grupo	Valor de p
Referência	X	C-PP	0,1543
	X	C-LPS4	0,0519
	X	C-LPS11	<b>0,0355</b>
	X	E	<b>0,0355</b>
C-PP	X	C-LPS4	0,1151
	X	C-LPS11	0,2341
	X	E	<b>0,0000</b>
C-LPS4	X	C-LPS11	0,7148
	X	E	<b>0,0000</b>
C-LPS11	X	E	<b>0,0005</b>

#### 4.5. DOSAGENS DE INTERLEUCINA 6

Conforme demonstrado no gráfico 11, a média das dosagens de IL6 do grupo E ( $36,0 \pm 11,23$  pg/ml) foi significativamente maior que os demais grupos e também que os valores de referência (tabela 9). O grupo C-LPS4 ( $12,58 \pm 2,47$  pg/ml) demonstrou valores significativamente maiores que os demais grupos e os valores de referência, exceto o grupo E.

**GRÁFICO 11 - Representação gráfica das médias e desvios-padrão das determinações da interleucina 6 em pg/ml (IL6).**



**TABELA 9 – Demonstrativo das comparações estatísticas entre as dosagens de interleucina 6 .**

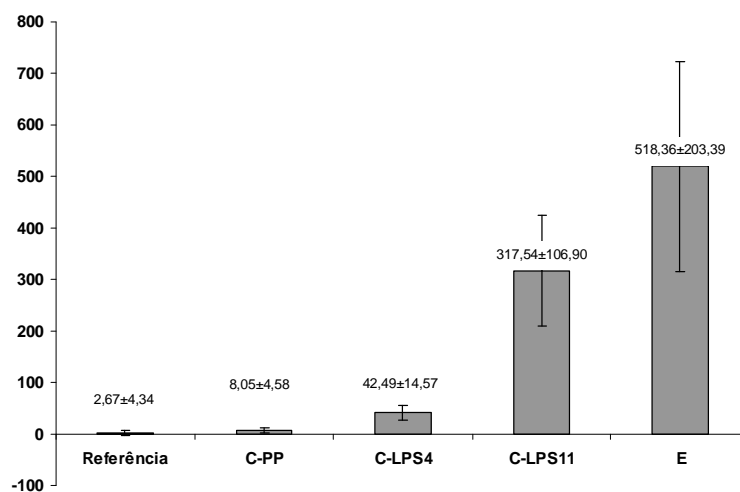
Grupo		Grupo	Valor de p
Referência	X	C-PP	0,9080
	X	C-LPS4	<b>0,0000</b>
	X	C-LPS11	0,0596
	X	E	<b>0,0000</b>
C-PP	X	C-LPS4	<b>0,0006</b>
	X	C-LPS11	0,1709
	X	E	<b>0,0000</b>
C-LPS4	X	C-LPS11	<b>0,0111</b>
	X	E	<b>0,0000</b>
C-LPS11	X	E	<b>0,0000</b>

#### 4.6 DOSAGENS DE FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA

Conforme demonstrado no gráfico 12, a média das dosagens de  $\text{TNF}\alpha$  do grupo E ( $518,36 \pm 203,39$  pg/ml) foi significativamente maior que os demais grupos e também que os valores de referência (tabela 10).

Os demais grupos C-LPS4 ( $12,58 \pm 2,47$  pg/ml), C-LPS11 ( $42,49 \pm 14,57$  pg/ml), C-PP demonstraram valores significativamente maiores que os valores de referência.

**GRÁFICO 12 - Representação gráfica das médias e desvios-padrão das determinações do fator de necrose tumoral alfa em pg/ml ( $\text{TNF}\alpha$ ).**



**TABELA 10 – Demonstrativo das comparações estatísticas entre as dosagens de fator de necrose tumoral alfa .**

Grupo		Grupo	Valor de p
Referência	X	C-PP	<b>0,0036</b>
	X	C-LPS4	<b>0,0000</b>
	X	C-LPS11	<b>0,0000</b>
	X	E	<b>0,0000</b>
C-PP	X	C-LPS4	<b>0,0000</b>
	X	C-LPS11	<b>0,0000</b>
	X	E	<b>0,0000</b>
C-LPS4	X	C-LPS11	<b>0,0000</b>
	X	E	<b>0,0000</b>
C-LPS11	X	E	<b>0,0269</b>

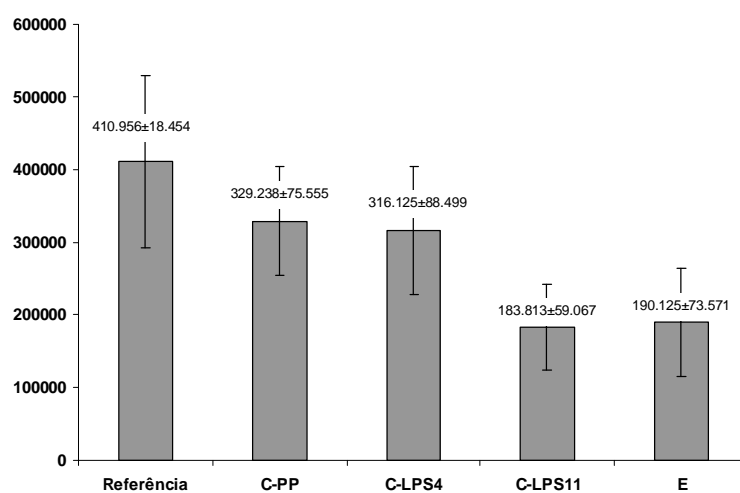


## 4.7 AVALIAÇÕES HEMATOLÓGICAS

### 4.7.1 Contagem de Plaquetas

Conforme demonstrado no gráfico 13, observaram-se diminuições significativas (tabela 11) nas contagens de plaquetas nos grupos E ( $p < 0,0000$ ), C-LPS11 ( $p < 0,0000$ ), e C-LPS4 ( $p < 0,0412$ ), em relação aos valores de referência.

**GRÁFICO 13 - Representação gráfica das médias e desvios-padrão das contagens de plaquetas /mm<sup>3</sup>.**



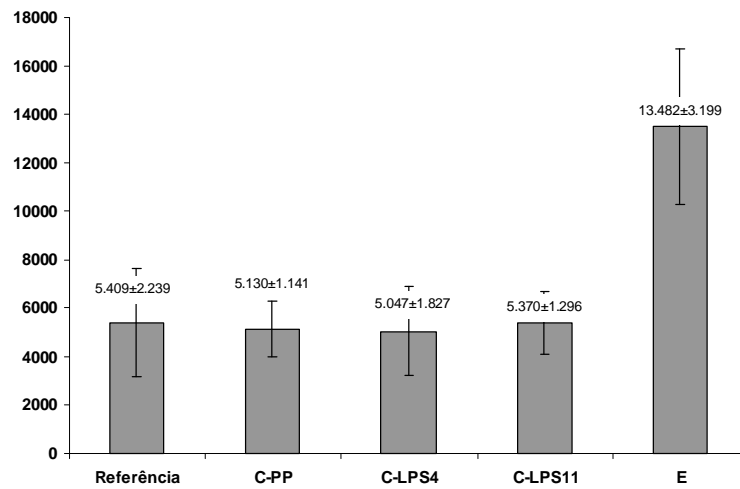
**TABELA 11 – Demonstrativo das comparações estatísticas entre as contagens de plaquetas .**

Grupo		Grupo	Valor de p
Referência	X	C-PP	0,0722
	X	C-LPS4	<b>0,0412</b>
	X	C-LPS11	<b>0,0000</b>
	X	E	<b>0,0000</b>
C-PP	X	C-LPS4	0,7546
	X	C-LPS11	<b>0,0007</b>
	X	E	<b>0,0022</b>
C-LPS4	X	C-LPS11	<b>0,0034</b>
	X	E	<b>0,0079</b>
C-LPS11	X	E	0,8526

### 4.7.2 Contagem de Leucócitos

Conforme demonstrado no gráfico 14, observou-se aumento significativo (tabela 12) na contagem de leucócitos no grupo E quando comparado aos demais grupos e aos valores de referência.

**GRÁFICO 14 - Representação gráfica das médias e desvios-padrão das contagens de leucócitos /mm<sup>3</sup>.**



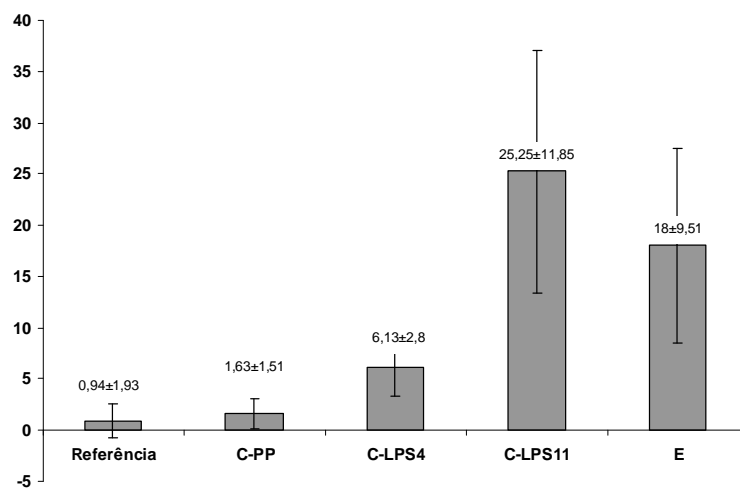
**TABELA 12 – Demonstrativo das comparações estatísticas das contagens de leucócitos .**

Grupo		Grupo	Valor de p
Referência	X	C-PP	0,7357
	X	C-LPS4	0,6751
	X	C-LPS11	0,9621
	X	E	<b>0,0000</b>
C-PP	X	C-LPS4	0,9153
	X	C-LPS11	0,7003
	X	E	<b>0,0000</b>
C-LPS4	X	C-LPS11	0,6901
	X	E	<b>0,0000</b>
C-LPS11	X	E	<b>0,0000</b>

### 4.7.3 Contagem de Bastonetes

Conforme demonstrado no gráfico 15, observou-se aumento significativo (tabela 13) na contagem de bastonetes nos grupos E e C-LPS11 aos valores de referência (0 a 10%).

**GRÁFICO 15 - Representação gráfica das médias e desvios-padrão das porcentagens de bastonetes.**



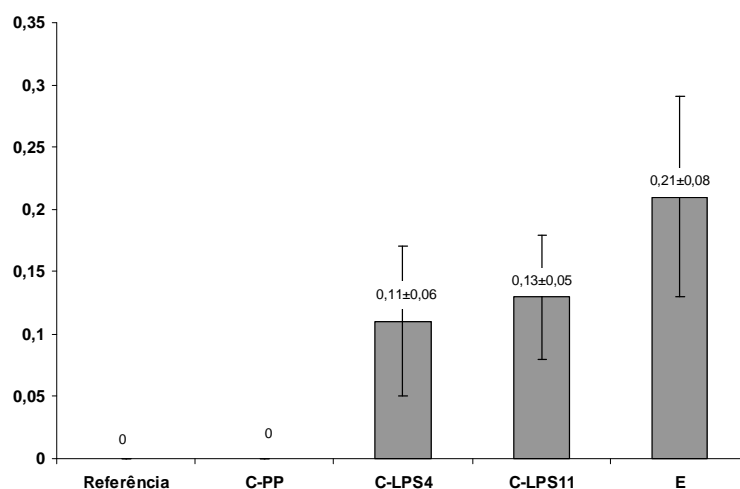
**TABELA 13 – Demonstrativo das comparações estatísticas das porcentagens de bastonetes.**

Grupo		Grupo	Valor de p
Referência	X	C-PP	0,2850
	X	C-LPS4	<b>0,0000</b>
	X	C-LPS11	<b>0,0000</b>
	X	E	<b>0,0000</b>
C-PP	X	C-LPS4	<b>0,0013</b>
	X	C-LPS11	<b>0,0001</b>
	X	E	<b>0,0002</b>
C-LPS4	X	C-LPS11	<b>0,0006</b>
	X	E	<b>0,0031</b>
C-LPS11	X	E	0,2380

#### 4.7 DOSAGEM DE ENDOTOXINA (LPS - Unidades Endotóxicas/ml)

Conforme demonstrado no gráfico 16, não houve detecção de endotoxina no grupo C-PP e nas amostras de referência. Observou-se que o grupo E apresentou média maior de endotoxina circulante ( $0,21 \pm 0,08$  UE/ml), de acordo com a tabela 14, observa-se que a média do grupo E quando comparada ao grupo C-LPS4 ( $0,11 \pm 0,06$  UE/ml) com  $p=0,0124$  e ao grupo C-LPS11 ( $0,13 \pm 0,05$  UE/ml) com  $p=0,0230$ . Entre os grupos C-LPS4 e C-LPS11 não houve diferença significativa ( $p=0,6186$ ).

**GRÁFICO 16 - Representação gráfica das médias e desvios-padrão das dosagens de endotoxina (UE/ml).**



**TABELA 14 – Demonstrativo das comparações estatísticas das dosagens de endotoxina.**

Grupo		Grupo	Valor de p
E	X	C-LPS4	<b>0,0124</b>
	X	C-LPS11	<b>0,0230</b>
C-LPS11	X	C-LPS4	0,6186

## ***5 Discussão***

---

## 5.1 O MODELO ANIMAL DE PNEUMOPERITÔNIO

Tradicionalmente os animais como cães e porcos são utilizados nos experimentos que pesquisam a cirurgia laparoscópica, devido a seu porte e a possibilidade de uso dos mesmos instrumentos utilizados em humanos, porém, em nosso meio, encontram-se obstáculos, como custos e dificuldades para alojamento destes animais. A utilização do rato como animal de experimentação na videocirurgia tem sido crescente nos últimos anos (BERGUER, GUTT e STIEGMANN, 1993; GOLDENBERG *et al.*, 1997).

Neste experimento de indução de pneumoperitônio optou-se pela utilização de ratos (*Rattus norvegicus*), devido ao seu pequeno porte e a disponibilidade em quantidades estatisticamente adequadas para validação de modelos experimentais.

Visando a aplicação dos conceitos éticos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, este experimento foi executado com os animais sob indução anestésica pela associação de ketamina e xilasina. Estas drogas anestésicas apresentam vantagens como melhor saturação periférica de oxigênio, estabilidade na frequência cardíaca e manutenção da temperatura corpórea, (FLECKNELL, 1987 e BACELAR, 1999), o que deve ser a causa da não ocorrência de mortes entre os ratos durante o presente estudo.

## 5.2 EFEITOS DE PNEUMOPERITÔNIO E DA ENDOTOXEMIA

A insuflação por CO<sub>2</sub> na cavidade abdominal não é um procedimento desprovido de riscos, seus efeitos adversos imediatos já são conhecidos. A supressão da resposta inflamatória e metabólica das células peritoneais, isquemia intestinal, produção de radicais livres e translocação bacteriana (ELEFTHERIADIS *et al.*, 1996); Aumento das catecolaminas plasmáticas (MIKAMI *et al.*, 1998), maior elevação do diafragma, com deslocamento pulmonar no sentido cefálico, redução do retorno venoso e do débito cardíaco (DEXTER *et al.*, 1999); Maior taxa de acidose metabólica e aumento nas

---

---

concentrações de potássio plasmático (PERNER *et al.*, 1999), alterações da integridade morfológica do mesotélio peritoneal (VOLZ *et al.*, 1999). Também foram descritos a depressão da imunidade celular, com aumento da atividade bacteriana peritoneal (DAPHAN *et al.*, 1999), paralelismo entre o aumento da pressão intra-abdominal e aumento da pressão da artéria pulmonar, aumento da pressão do sistema capilar arterial pulmonar e diminuição da concentração de oxigenação arterial (WINDBERGER *et al.*, 1999).

Na tentativa de redefinir melhores parâmetros de indução de pneumoperitônio, outros estudos compararam a utilização de diferentes gases e também das condições da insuflação intra-abdominal.

SALA-BLANCH *et al.*, (1998) em porcos anestesiados e mantidos sob ventilação mecânica realizaram insuflação da cavidade abdominal com CO<sub>2</sub> em um grupo e no outro com Hélio, até o máximo de 15mmHg de pressão intra-abdominal. Definiram que os dois gases utilizados na insuflação abdominal reduzem o fluxo sanguíneo hepático pelo aumento da pressão intra-abdominal, porém, na utilização do gás Hélio, sugerem que este gás induz maior redução no fluxo sanguíneo hepático.

O pré-tratamento dos gases a serem insuflados na cavidade abdominal, como aquecimento e filtração ou hidratação foram avaliados por Ott *et al.*, (1998) em humanos e demonstraram que estes tratamentos reduzem ou evitam a hipotermia induzida pelo pneumoperitônio, além de propiciarem menos dor no pós-operatório, com maior conforto e menor tempo de permanência no hospital.

PUTTICK *et al.*, (1999), compararam em humanos o uso do CO<sub>2</sub> aquecido a 37°C e à temperatura ambiente, demonstrando vantagens do gás aquecido em relação ao não resfriamento corporal no intra e no pós-operatório. Revelaram ainda que com o gás à temperatura ambiente, há elevação das citocinas intraperitoneais, o que ocorre minimamente com o gás aquecido. Controversamente, NELSKYLA *et al.*, (1999), em estudo com 37 pacientes submetidas à histerectomia laparoscópica, não demonstraram nenhuma diferença estatística entre os grupos com gás normal em relação ao uso de gás aquecido, concluindo que o último não evita a hipotermia.

---

No presente estudo experimental foi utilizado o CO<sub>2</sub> por ser o gás rotineiramente empregado em cirurgias videolaparoscópicas em nosso meio, havendo diversas comprovações de sua inocuidade e suas inúmeras vantagens como: biodegradabilidade, a disponibilidade, o baixo custo, fácil manuseio e não ser inflamável. O CO<sub>2</sub> é cerca de vinte vezes mais solúvel no sangue e nos fluidos orgânicos que o oxigênio e o ar atmosférico. Pode ser absorvido na velocidade de 100 ml/minuto sem efeitos colaterais sendo eliminado pelas vias aéreas. Pode ocorrer alteração do pH do sangue, taquicardia e arritmias cardíacas que geralmente são corrigidos pela hiperventilação da paciente (respiração assistida) monitorização da pressão intra-abdominal, por controle do oxímetro e do capnógrafo. A embolia por CO<sub>2</sub> pode ser fatal, e sua incidência varia de 1:10.000 a 1:60.000. Outros tipos de gases têm sido propostos como Óxido Nitroso, Argônio e Hélio (FERNANDEZ-CRUZ *et al.*, 1998; JUNGHANS *et al.*, 1999).

Em relação à pressão ideal para o pneumoperitônio, há também muita discussão e muitos estudos a respeito. Para a realização de colecistectomia laparoscópica, concluíram ser 7mmHg uma PIA que permite o procedimento ser executado com facilidade e segurança, minimizando os efeitos hemodinâmicos adversos da insuflação peritoneal (DAVIDES *et al.*, 1999).

Em relação à sepse, conforme descrito por FINK em 1990 e 2001, os estudos experimentais em sepse devem considerar as vantagens e desvantagens de cada espécie animal, conforme for o propósito do estudo a ser executado. Este autor ao questionar porque algumas vezes os modelos animais falham ao mimetizar a sepse humana, concluiu que os problemas destes estudos estavam justamente nas suas concepções básicas, e apontou as seguintes falhas : animais demasiadamente jovens (recém desmamados), enquanto que na população humana a sepse tem maior prevalência em idosos e ainda portadores de co-morbidades como o diabetes, doenças vasculares sistêmicas, hipertensos, imunodeprimidos e portadores de câncer. Aponta também a forma de indução da sepse, que ao contrário do desafio (única inoculação) executado nos estudos animais, nos seres humanos ela ocorre com maior frequência por mais de uma bactéria e esta, é presente em



---

um foco infeccioso persistente, com liberação de fatores de virulência bacterianos de modo contínuo.

Ainda em relação à indução da sepse, estão relatados estudos em que o agente desencadeante é bacteriano, através da inoculação de células viáveis, ou somente o componente celular efetivamente responsável pela eclosão da sepse, o lipopolissacarídeo ou endotoxina. Não foi encontrado na literatura consultada qual destes seria o mais adequado, outrossim, observaram-se múltiplos métodos propostos, em relação às bactérias, suas vias de inoculação e doses, da mesma forma em relação ao emprego de LPS.

A bactéria mais utilizada para estes estudos é a *Escherichia coli*, por ser a principal representante da flora fecal humana e de ratos e, portanto, a mais relacionada nos casos humanos de sepse. Outras bactérias também são mencionadas como a *Pseudomonas aeruginosa* e a *Klebsiella pneumoniae*. No presente estudo optou-se pela *Escherichia coli* justamente por ser disponível em nosso meio, tanto da cepa 0111:B4 procedente da coleção da Fundação Oswaldo Cruz, quanto o seu LPS tipo específico, obtido comercialmente. Procurou-se com isto diminuir as possibilidades de discrepâncias motivadas pelo binômio bactéria-LPS, uma vez que apesar desta molécula possuir uma conformação lipopolissacarídica comum, ela diverge entre as bactérias nas seqüências de carboidratos terminais e no próprio lipídeo A, como acontece com a *Neisseria meningitidis* e em outras cepas de enterobactérias e seus respectivos lipopolissacarídeos.

Optou-se pela dose de 10mg/kg ao serem observados os estudos de FINK em 2001, nos quais o autor aponta resultados das avaliações por eles procedidas, similares às avaliações em humanos.

Sabe-se que os ratos são bastante refratários aos efeitos de doses baixas do LPS, o que em pesquisas a este respeito, REMICK e WARD, em 2005, constataram que a transcrição do fator  $\text{NFK}\beta$ , em ratos requer maiores estímulos para a sua ativação e conseqüente liberação de  $\text{TNF}\alpha$ . Contrapondo este fenômeno, em seres humanos, tanto em doentes com sepse ou em voluntários, doses bem menores de LPS circulante, medidas em

---

---

nanogramas, já são suficientes para a ocorrência dos sinais cardeais da sepse e de alterações laboratoriais típicas AKAMINE *et al.*, 1998.

No presente estudo foi escolhida a pressão intra-abdominal de 10mmHg, por uma hora de duração, baseados no estudo de Hajar, Repka e Canan Junior (2002) e resultados similares quanto à sobrevivência dos animais na pressão intra-abdominal de 10mmHg por uma hora de duração observados por Hamilton *et al.* em 1998, embora não tenham explicado a fisiopatologia da oligúria ocorrida nos animais e a elevação das concentrações de vasoconstritor endotelial. Neste estudo não foi observada a alteração da função renal no grupo controle (C-PP) submetido somente ao pneumoperitônio, quanto à dosagem de creatinina (tabela 3), resultado que está de acordo aos obtidos por Santos *et al.* em 2005. Contudo, com referência à dosagem de uréia houve aumento significativo neste grupo com  $p=0,0000$ , em relação aos valores de referência (tabela 3).

Quando foram avaliados estes resultados de uréia e creatinina nos ratos sob pneumoperitônio e em vigência de endotoxemia, observou-se aumento significativo nestas dosagens quando comparados aos grupos controle C-PP sendo dosagens de uréia  $p=0,0000$ , e de creatinina  $p=0,0013$ , o que demonstra a influência da endotoxemia na disfunção renal quando sob pressão intra-abdominal de 10mmHg por uma hora. Estes resultados estão em acordo aos achados de McDougall *et al.*, em 1997, que descreveram o decréscimo na velocidade de fluxo na veia renal com conseqüente oligúria e também aos resultados descritos por Fagundes *et al.* em 2000, que definiram o efeito do pneumoperitônio em ratos através de alterações significantes dos valores de AST, uréia, creatinina, pH,  $pO_2$  e  $PCO_2$ , na pressão de 4 mmHg, somente ocorreram alterações da uréia, pH e  $pO_2$ .

Estes achados podem ser explicados pela associação hipoperfusão tecidual causada tanto pela endotoxemia (McDOUGALL *et al.*, 1997) como pelo pneumoperitônio (KOPERNIK *et al.*, 1998; DIEBEL, DULCHAVSKY e WILSON, 1992; KOTZAMPASSI *et al.*, 1993; ISHIZAKI *et al.*, 1993 e RASMUSSEN *et al.*, 1995) e também pela lesão inflamatória induzidas pela endotoxina. Esta associação induz dano isquêmico e disfunção tubular renal.

---

---

Ocorre ainda oligúria progressiva com queda da taxa de filtração glomerular e elevação da creatinina. Tem sido descrito que a instalação do quadro de insuficiência renal incrementa a morbimortalidade, apesar da terapia renal substitutiva precoce (BORGES, 1996), sendo que a insuficiência renal aguda, associada a sepse, determina um prognóstico extremamente reservado, com taxas de mortalidade de até 80% (AKAMINE *et al.*, 1998).

Quanto à função hepática, Akamine *et al.*, em 1998 definiu que em humanos as alterações ocorrem tardiamente, no curso da sepse. A colestase é a manifestação mais comum, caracterizando-se por uma elevação das bilirrubinas, predominantemente direta, sem obstrução biliar e sem grandes aumentos nas transaminases. As hipóteses para explicar tal condição são: diminuição do fluxo sanguíneo hepático, congestão venosa e lesão inflamatória dos hepatócitos, acarretando uma alteração funcional nos mesmos. O aparecimento de icterícia é um sinal de pior prognóstico na sepse. Só mais tardiamente aparecem os quadros de insuficiência hepática e encefalopatia.

O principal órgão que responde à endotoxemia é o fígado, sendo que este órgão pode falir em decorrência do choque por LPS, mesmo com intervenção terapêutica. A inalação de LPS, em humanos, conduz à superprodução de mediadores inflamatórios (FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2004; JANSSON, ERIKSSON & WANG, 2005).

No presente estudo experimental com a inoculação de 10mg/kg de LPS ocorreram alterações hepáticas significantes, observadas pelas elevações das bilirrubinas direta e total e das transaminases (tabelas 4, 5, 6 e 7), especialmente com a associação ao pneumoperitônio.

Estudos do pneumoperitônio em animais demonstraram redução do fluxo sanguíneo portal, hepático e intestinal (WINDBERGER *et al.*, 1999 e por FAGUNDES *et al.*, em 2000).

As anormalidades habituais hematológicas descritas por Akamine *et al.*, em 1998 na endotoxemia em humanos são caracterizadas por leucocitose, com aumento do número de bastonetes e linfopenia. Eventualmente, pode haver leucopenia, o que parece ter um prognóstico mais sombrio. A trombocitopenia ocorre devido a um consumo periférico

---

aumentado. O quadro de coagulação intravascular disseminada (CIVD) pode se desenvolver pelo estímulo inflamatório da coagulação e se caracteriza por facilitar o sangramento e por deposição de fibrina na microcirculação, com conseqüente isquemia de órgãos. No presente estudo, conforme tabela 8 pode-se observar o alargamento do TAP nos ratos do grupo E, de forma significativa ( $p=0,0355$ ), quando comparados ao grupo referência e ao grupo C-PP. Quanto à plaquetopenia, ocorreu alterações significantes também no grupo E e no grupo C-LPS11 (tabela 11).

Mais recentemente em 2004, conforme descrição do Consenso Brasileiro de Sepse na sepse podem ser observadas leucocitose ou leucopenia (leucócitos  $>12.000/mm$  ou  $<4.000/mm$ ) ou presença de  $>10\%$  de formas jovens (bastões). No presente estudo ocorreram alterações típicas da sepse humana na endotoxemia induzida nos ratos. Observaram-se no presente estudo, conforme descrito na tabela 12, leucocitose significativa no grupo E e nos demais grupos estes valores foram normais. Este fato pode ser explicado pelo simultâneo aumento do TNF alfa e da Interleucina 6 (tabelas 9 e 10) que por serem citocinas pró-inflamatórias, têm ações estimuladoras na liberação de leucócitos, o que também justifica a ocorrência de bastonetes nos grupos C-LPS11 e E (tabela 12). A administração de endotoxina de bactérias Gram-negativas a ratos resulta em hipotensão sistêmica, aumento do hematócrito, aumento do número de leucócitos circulantes e plaquetas. Essas alterações podem ser parcialmente atribuídas à ativação do complemento e geração de anafilatoxinas pela endotoxina (SMEDEEGARD, CUI e HUGLI, 1989).

O mecanismo de ativação dos macrófagos pelo LPS se inicia pela ligação do LPS (através de sua porção tóxica, o lipídio A) a uma proteína específica, denominada LPS-LBP (*LPS-binding protein*) no plasma, acelerando a ligação do LPS ao CD14, um receptor primário de LPS, que é expresso na maioria dos macrófagos. O complexo LPS-CD14 inicia a sinalização intracelular para interagir com o receptor de membrana, TLR-4, resultando na ativação dos macrófagos.

---

A ativação dos macrófagos conduz à biossíntese de diversos mediadores inflamatórios, como o TNF- $\alpha$ , a IL-1  $\beta$  e a IL-6 e co-estimula a produção de algumas moléculas necessárias para a resposta imune adaptativa (RAETZ e WHITFIELD, 2002).

No presente estudo foi descrito a endotoxemia pela detecção de níveis circulantes de LPS nos grupos inoculados (C-LPS4, C-LPS11 e E) e a sua não detecção no grupo Referência. Utilizou-se para esta finalidade o método do *Limulus*, já consagrado e habitualmente utilizado para esta finalidade. Da mesma forma a metodologia para a detecção de TNF alfa e IL-6, por técnica imunoenzimática.

Desta forma este estudo permite concluir que a indução de pneumoperitônio em vigência de sepse pode agravar as funções hepáticas e renais em ratos.

---

## ***6 Conclusões***

---

O pneumoperitônio por dióxido de carbono acentua: a liberação de TNF $\alpha$  e de IL6 e piora as funções hepática e renal em modelo experimental de endotoxemia induzida por LPS.

---

## *Referências Bibliográficas*

---



1. ABBAS A.K.; LICHTMAN, A.H. Citocinas (capítulo 11), Imunidade Inata (capítulo 12). In: \_\_\_\_\_ **Imunologia Celular e Molecular**. 5ª edição. Rio de Janeiro, Elsevier, p. 267-301, 2004.
2. AKAMINE, N.; FERNANDES JUNIOR, C.J.; WEY, S.B.; KNOBEL, E. **Choque séptico e mecanismos de agressão tecidual**. In: KNOBEL, E. editor. *Conduitas no paciente grave*, 2ª edição, São Paulo: Atheneu. p.17-46. 1998.
3. ANGUS, D.C.; LINDE-ZWIRBLE, W.T.; LIDICKER, J.; CLERMONT, G.; CARCILLO, J.; PINSKY, M.R. Epidemiology of severe sepsis in the United States, analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Crit Care Med**, New York, v.29, p.1303-1310, 2001.
4. ARAÚJO FILHO, I.; HONORATO SOBRINHO, A.A.; REGO, A.C.M.; GARCIA, A.C.L.M.A.; FERNANDES, D.P.; CRUZ, T.M.; COSTA, T.C.; MEDEIROS, A.C. Influence of laparoscopy and laparotomy on gasometry, leukocytes and cytokines in a rat abdominal sepsis model. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v.21, n.2, p.74-79, 2006.
5. BACELAR JUNIOR, J.C.S. **Avaliação da ação das drogas hidrato de cloral, cetamina/xilasina e tiopental sódico na anestesia em ratos**. [dissertação] Curitiba (PR): Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná; 1999.
6. BAZAN, J.F. Emerging families of cytokines and receptors. **Curr Biol**, London, v.3, n.9, p.603-606. 1993
7. BENBAREK, H.; DEBY-DUPONT, G.; CAUDRON, I.; GRULKE, S.; DEBY, C.; LAMY, M.; SERTEYN, D. Interactions between lipopolysaccharides and blood factors on the stimulation of equine polymorphonuclear neutrophils. **Vet Immunopathol**, Amsterdam, v.64, n.4, p.313-322, 1998.
8. BERGAMASCHI, R.; BONJER, H.J.; CUSCHIERI, A.; FUCHS, K.H.; JACOBI, C.; JANSEN, F.W.; KOIVUSALO, A.M.; LACY, A.; MCMAHON, M.J.; MILLAT, B.; SCHWENK, W. **The E.A.E.S. Clinical Practice Guideline on the Pneumoperitoneum for Laparoscopic Surgery**. Held at the Ninth International Congress of the European Association for Endoscopic Surgery (E.A.E.S.), Maastricht, June 13 - 15, 2001.
9. BERGUER, R., GUTT, C.N., STIEGMANN, G.V. Laparoscopic surgery in the rat: description of a new technique. **Surg Endosc**, New York, v.7, p.345-4, 1993.
10. BERGUER, R.; CORNELIUS, T.; DALTON, M. The optimum pneumoperitoneum pressure for laparoscopic surgery in the rat model. **Surg Endosc**, New York, v.11, p.915-918, 1997.
11. BERTÓK, L. Role of endotoxins and bile acids in the pathogenesis of septic circulatory shock. **Acta Chir Hung**, Budapest, v.36, n.4, p.33-36, 1997.
12. BEUTLER, B. Innate immune sensing of microbial infection, the mechanism and the therapeutic challenge. **Wien Med Wochenschr**, Wien, v.152, p.547-551, 2002.
13. BEUTLER, B.; RIETSCHEL, E.T. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin. **Nature**, London, v.3, p.169-176, 2003.
14. BORGES, C.R.M.; LASCOWSKI, K.M.S.; FILHO, N.R.; PELAYO, J.S. Microbiological quality of water and dialysate in a haemodialysis unit in Ponta Grossa-PR, Brazil, **Journal of Applied Microbiology**. 2007. v.103,n.5, p.1791-1797.
15. BOTTER, F. C. S.; TAHA, M.O.; FAGUNDES, D.J.; FAGUNDES, A.T.N. O papel do pneumoperitônio na avaliação de parâmetros respiratórios e hemodinâmicos de ratos anestesiados, com ou sem intubação intratraqueal. **Rev Col Bras Cir**, Rio de Janeiro, v.32, n.5, p.261-266, 2005.
16. CALDWELL, C.B.; RICOTTA, J.J. Changes in visceral blood flow with elevated intra-abdominal pressure. **J Surg Res**, New York, v.43, p.14-20, 1992.
17. CHIDA, V.V.; MOREIRA, M.B.; LEME, L.F.P.; FAGUNDES, D.J.; RAMALHO, C.E.B.; NOVO, N.F.; A, MONTERO, E.F.S. Estudo da função hepática de ratos espontaneamente hipertensos submetidos a diferentes pressões de pneumoperitônio com CO<sub>2</sub>. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v.18, n.1, p.01-12, 2003 .
18. COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, London, v.420, p.885-891, 2002.

19. COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL - COBEA, Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação, São Paulo, UNIFESP-EPM/AFIP/FAPESP, 2000, Disponível em <http://www.cobea.org/principios.htm>. Acessado em fevereiro de 2008.
  20. Consenso Brasileiro de Sepse. <http://WWW.einstein.br/sepse/html/consenso.htm>. Acessado em fevereiro de 2008.
  21. CREMA, E.; SILVA, B.F.; SILVA, P.L.; RODRIGUES JÚNIOR, V.; CUNHA, F. Innovative technique for the study of pneumoperitoneum in the evaluation of abdominal pain after chemical irritation with zymozan. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v.23, n.3, p. 258-261. 2008 .
  22. DAPHAN, C. E.; AGALAR, F.; HASCELIK, G.; ONAT, D.; SAYEK, I. Effects of laparotomy, and carbon dioxide and air pneumoperitoneum on cellular immunity and peritoneal host defences in rats. **Eur J Surg**, Oslo, v.165, n.3, p.253-8,1999.
  23. DAVIDES, D.; BIRBAS, K.; VEZAKIS, A.; McMAHON, M. J. Routine low-pressure pneumoperitoneum during laparoscopic cholecystectomy. **Surg Endosc**, New York, v.13, n.9, p.887-9, 1999.
  24. DECKER T. Comparative study of cytotoxicity, tumor necrosis factor, and prostaglandin release after stimulation of rat Kupffer cells, murine Kupffer cells, and murine inflammatory liver macrophages. **J Leuk Biol**, Winston-Salem, v.45, p.139-146, 1989.
  25. DEXTER, S. P.; VUCEVIC, M.; GIBSON, J.; McMAHON, M. J. Hemodynamic consequences of high-and low-pressure capnoperitoneum during laparoscopic cholecystectomy. **Surg Endosc**, New York, v.13, n.4, p.376-81,1999.
  26. DIEBEL, L. N.; DULCHAVSKY, S. A.; WILSON, R. F. Effect of increased intra-abdominal pressure on mesenteric arterial and intestinal mucosal blood flow. **J Trauma**, Baltimore, v.33, n.1, p.45-49, 1992.
  27. DIKS, S. H.; RICHEL, D. J.; PEPPELENBOSCH, L. P. S. Signal transduction: the picture is becoming more complex. **Curr Top Med Chem**, Netherlands, v.4, p.1115-1126, 2004.
  28. DIMBARRE, D. **Influência do pneumoperitônio na população bacteriana intra-peritoneal e na ocorrência de bacteremia em ratos Wistar com peritonite induzida**. [dissertação] Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 1999.
  29. DINARELLO C.A.; RENFER, L.; WOLFF, S.M. Human leukocytic pyrogen, purification and development of a radioimmunoassay. **Proc Natl Acad Sci**, Washington, 74, n.10, p.4624-4627, 1977.
  30. DINARELLO, C.A. Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest**, Park Ridge, v.112, p.321s-329s. 1997.
  31. ELEFTHERIADIS, E.; KOTZAMPASSI, K.; PAPANOTAS, K.; HELIADIS, N.; SARRIS, K. Gut ischemia, oxidative stress, and bacterial translocation in elevated abdominal pressure in rats. **World J Surg**, New York, v.20, n.1, p.11-16, 1996.
  32. FADEL, M.V.T. **Uso de corticosteroide na infecção grave de origem peritoneal por bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, experimentalmente induzida em camundongos**. [dissertação] Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 1996.
  33. FAGUNDES, M.A.V.; NIGRO, A.J.T.; MONTERO, E.F.S.; NOVO, N.F.; JULIANO, Y. Efeitos do pneumoperitônio no rato. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v.15, suppl.1, p.39-39, 2000.
  34. FERNANDEZ-CRUZ, L.; SAENZ, A.; TAURA, P.; SABATER, L.; ASTUDILLO, E.; FONTANALS, J. Helium and carbon dioxide pneumoperitoneum in patients with pheochromocytoma undergoing laparoscopic adrenalectomy. **World J Surg**, New York, v.22, n.12, p.1250-1255, 1998.
  35. FERNANDEZ-MARTINES, E, MORALES-RIOS MS, PEREZ-ALVARES V, MURIEL P. Immunomodulatory effects os thalidomide analogs on LPS-induced plasma and hepatic cytokines in rat. **Biochem Pharmacol** 2004. 68:1321-1329.
  36. FINK, M.; Animal models of sepsis and the multiple organ dysfunction syndrome. **J Surg Res**, New York, p.875-891, 2001.
  37. FINK, M.O.; HEARD, S. Laboratory models of sepsis and septic schock. **J Surg Res**, New York, v.49, p.186-196, 1990.
-

38. FLECKNEL, A. Laboratory animal anesthesia. **Academic Press**. San Diego, 1987.
39. FRANCO DE SOUZA, C.J. **Peroxidação lipídica intestinal no pneumoperitônio produzido por dióxido de carbono em ratos Wistar**. [dissertação] Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 2003.
40. FREUDENBERG, M.A.; GALANOS, C. Bacterial endotoxins: biological properties and mechanisms of action. **Mediators Inflamm**, New York, v.2, n.7, p.S11-16, 1990.
41. GANGLOFF, S.C.; HIJIYA, N.; HAZIOT, A.; GOYERT, S.M. Lipopolysaccharide structure influences the macrophage response via CD14-independent and CD14-dependent pathways. **Clin Infec Dis**, Chicago, v.28, n.3, p.491-496, 1999.
42. GIACOMETTI, A.; CIRIONI, O.; GHISELLI, R.; ORLANDO, F.; KAMYSZ, W.; ROCCHI, M.; D'AMATO, G.; MOCCHIEGANI, F.; SILVESTRI, C.; LUKASIAK, J.; SABA, V.; SCALISE, G. Effects of pexiganan alone and combined with betalactams in experimental endotoxic shock. **Peptides**, New York, v.26, n.2, p.207-216, 2005.
43. GOLDENBERG, A.; LOBO, E.J.; MARCONDES, W.; LOUZADA, M.; BARBOSA, C.D.L. Proposição de videolaparoscopia em ratos. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v.12, n.4, p.219-220, 1997.
44. GOSH, S.; BALTIMORE, D. Activation in vitro of NF-kappa B by phosphorylation of its inhibitor I kappa B. **Nature**, London, v.12, n.344, p.678-682, 1990.
45. GRAPHPAD SOFTWARE [computer program]. **InStat guide to choosing and interpreting statistical tests**. San Diego, California, USA. Copyright 1992-1998. GraphPad Software Inc. <http://www.graphpad.com>.
46. GUARISCHI, A. Videocirurgia em oncologia – mitos e verdades. **Rev Col Bras Cir**, Rio de Janeiro, v.34, n.5, p.283-284, 2007.
47. HAJAR, N.; REPKA, J.C.D.; CANAN JUNIOR, L.W. Ação do pneumoperitônio com dióxido de carbono na translocação bacteriana em ratos. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v.17, n.3, p.181-188, 2002.
48. HAMILTON, B. D.; CHOW, G. K.; INMAN, S. R.; STOWE, N.T.; WINFIELD, H. N. Increased intra-abdominal pressure during pneumoperitoneum stimulates endothelin release in a canine model. **J Endourol**, New York, v.12, n.2, p.193-197, 1998.
49. Instituto Nacional de Metrologia [INMETRO]. Normalização e Qualidade Industrial. **Orientações sobre calibração e rastreabilidade das medições em laboratórios**. DOQ-DIMCI-003, 1999.
50. ISHIZAKI, Y.; BANDAI, Y.; SHIMOMURA, K.; ABE, H.; OHTOMO, Y.; IDEZUKI, Y. Changes in splanchnic blood flow and cardiovascular effects following peritoneal insufflation of carbon dioxide. **Surg Endosc**, New York, v.7, n.5, p.420-423, 1993.
51. JANSSON, A.H.; ERIKSSON, C.; WANG, X. Effects of budesonide and N-acetylcysteine on acute lung hyperinflation, inflammation and injury in rats. **Vasc Pharmacol**, New York, v.43, n.2, p.101-111, 2005.
52. JUNGHANS, T.; BOHM, B.; NEUDECKER, J.; MANSMANN, U.; GRUNDEL, K. Effects of argon gas embolism during pneumoperitoneum. **Chirurg**, Berlin, v.70, n.2, p.184-8. 1999.
53. KAWAHARA, N.T.; ALSTER, C.; FONTES, B. Videolaparoscopia no trauma toracoabdominal. Capítulo 27. In: POGGETTI, R.; FONTES, B.; BIROLINI, D. **Cirurgia do Trauma**. 1ª edição. São Paulo, Editora Roca LTDA, p.257-263, 2007.
54. KOPERNIK, G.; AVINOACH, E.; GROSSMAN, Y.; LEVY, R.; YULZARI, R.; ROGACHEV, B.; DOUVDEVANI, A. The effect of a high partial pressure of carbon dioxide environment on metabolism and immune functions of human peritoneal cells-relevance to carbon dioxide pneumoperitoneum. **Am J Obstet Gynecol**, St.Louis, Dec, v.179, n.6pt1, p.1503-10, 1998.
55. KOTZAMPASSI, K.; KAPANIDIS, N.; KAZAMIAS, P.; ELEFThERIADIS, E. Hemodynamic events in the peritoneal environment during pneumoperitoneum in dogs. **Surg Endosc**, New York, v.7, p.494-499, 1993.
56. LEU, T.; CHAROENFUPRASERT, S.; YEN, C.; FAN, C.; MAA, M. Lipopolysaccharide-induced c-Src expression plays a role in nitric oxide and TNF $\alpha$  secretion in macrophages. **Mol Immunol**, Oxford, v.43, n.4, p.308 – 316, 2005.

57. LINHARES JÚNIOR, L.D. **Estudo da disseminação hematogênica de bactérias em ratos com peritonite bacteriana submetidos à limpeza mecânica da cavidade peritoneal por laparotomia ou por videolaparoscopia.** [dissertação] Curitiba (PR): Universidade Federal do Paraná; 1999.
58. MATSUMOTO, T.; DOLGOR, B.; NINOMIYA, K.; BANDO, T.; YOSHIDA, T.; KITANO, S. Effect of CO<sub>2</sub> pneumoperitoneum on the systemic and peritoneal cytokine response in a LPS-induced sepsis model. **Eur Surg Res**, Basel, 2001. 33, n.2, p.71-76.
59. McDOUGALL, E.M.; BENNETT, H.F.; MONK, T.G.; SIEGEL, C.L.; LI, D.; McFARLAND, E.G.; CLAYMAN, R.V.; SHARP, T.; RAYALA, H.J.; MILLER, S.B.; HAACKE, E.M. Functional MR imaging of the porcine kidney, physiologic changes of prolonged pneumoperitoneum. **JSLs**, Miami, v.1, n.1, p.29-35, 1997.
60. MELO, M.A.C.; ALBUQUERQUE, O.F.; GONDIM, V. Colectomia laparoscópica em pacientes de alto risco. **Rev Col Bras Cir**, v.30, n.1, p.11-15. 2003.
61. MIKAMI, O.; FUJISE, K.; MATSUMOTO, S.; SHINGU, K.; ASHIDA, M.; MATSUDA, T. High intra-abdominal pressure increases plasma catecholamine concentrations during pneumoperitoneum for laparoscopic procedures. **Arch Surg**, Chicago, v.133, n.1, p.39-43, 1998.
62. MUROI, M.; TANAMOTO, K. The polysaccharide portion plays an indispensable role in Salmonella lipopolysaccharide-induced activation of NFκB through human Toll-like receptor 4. **Infect Immun**, Bethesda, v.70, p.6043-6047, 2002.
63. NELSKYLA, K.; YLI-HAHKALA, A.; SJOBERG, J.; KORHONEN, I.; KORTTILA, K. Warming of insufflation gas during laparoscopic hysterectomy, effect on body temperature and the autonomic nervous system. **Acta Anaesth Scand**, Copenhagen, v.43, n.10, p.974-978, 1999.
64. NOLAN, J.P.; Endotoxin, reticuloendothelial function and liver injury, **Hepatology**, Baltimore, v.1, n.5, p.458-465, 1981.
65. OGIKUBO, Y.; NORIMATSU, M.; SASAKI, Y.; YASUDA, A.; SAEGUSA, J.; TAMURA, Y. Effect of lipopolysaccharide (LPS) injection on the immune responses of LPS-sensitive mice. **J Vet Med Sci**, Tokyo, v.66, n.10, p.1189-1193, 2004.
66. OTT, D.E.; REICH, H.; LOVE, B.; McCORVEY, R.; TOLEDO, A.; LIU, C.Y.; SYED, R.; KUMAR, K. Reduction of laparoscopic-induced hypothermia, postoperative pain and recovery room length of stay by pre-conditioning gas with the Insuf low device, p.a prospective randomized controlled multi-center study. **JSLs**, Miami, v.2, n.4, p.321-329, 1998.
67. ÖZGÜN, H.; BOYLU, S.; ÇEVİKEL, M.H.; YENİSEY, Ç.; ERPEK, H.; ÇULHACI, N.; DEMIRKIRAN, A.E. Effects of pneumoperitoneum with or without colostomy on rat colonic anastomotic healing. **ANZ Journal of Surgery**, Carlton, v.74, n.3. p.158-163, 2004.
68. PACHECO, P.E.L. **Tratamento da endotoxemia equina.** [Monografia] Jaguariúna (SP): Faculdade de Jaguariúna; 2007.
69. PARILLO, J.E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **N Engl J Med**, Boston, v. 328, n.20, p.1471-1477, May, 1993.
70. PERNER, A.; BUGGE, K.; LYNG, K. M.; SCHULZE, S.; KRISTENSEN, A.; BENDTSEN, A. Changes in plasma potassium concentration during carbon dioxide pneumoperitoneum. **Br J Anaesth**, Altrincham, v.82, n.1, p.137-139, 1999.
71. PERRISAT, J.; COLLET, D.; BELLIARD, R. Laparoscopic cholecystectomy, the state of art. A report on 700 consecutive cases. **World J Surg**, New York, v.16, p.1074-1082, 1992.
72. PETROIANU, A.; CARVALHO, E.; CARNEIRO, B.G.M.; RODRIGUES, F.H.O.C.; ROCHA, R.F. Avaliação da reinfecção peritoneal após peritonite fecal em ratos. **Rev Col Bras Cir**, Rio de Janeiro, v.31, n.2, p.90-94, 2004.
73. PITOMBO, M.B.; FARIA C.A.S.A.; BERNARDO, L.C.; STEINBRUCK, K.; BERNARDO FILHO, M. Dissemination of bacteria labeled with technetium<sup>99m</sup> after laparotomy and abdominal insufflation with different CO<sub>2</sub> pressures on rats. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v.23, n.1, p.48-54. 2008 .
74. PUTTICK M.I.; SCOTT-COOMBES, D.M.; DYE, J.; NDUKA, C.C.; MENZIES-GOW N.M.; MANSFIELD, A.O.; DARZI, A. Comparison of immunologic and physiologic effects of CO<sub>2</sub>

- pneumoperitoneum at room and body temperatures. **Surg Endosc**, New York, v.13, n.6, p.572-575. 1999.
75. RAETZ, C.R.H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Ann Rev Biochem**, Palo Alto, v.71, p.635-700, 2002.
76. RASMUSSEN, I.B.; BERGGREN, U.; ARVIDSSON, D.; LJUNGDAHL, M.; HAGLUND, U. Effects of pneumoperitoneum on splanchnic hemodynamics, a experimental study in pigs. **Eur J Surg**, Oslo, v.161, n.11, p.819-826,1995.
77. REMICK, D.; WARD, P.A. Evaluation of endotoxin models for the study of sepsis. **Shock**, 2005; s1:7-11.
78. ROSENTHAL, R.J.; FRIEDMAN, R.L.; PHILLIPS, E.H. **The Pathophysiology of Pneumoperitoneum**. New York, Springer, p.1-187. 1998.
79. SALA-BLANCH, X.; FONTANALS, J.; MARTINEZ-PALLI, G.; TAURA, P.; DELGADO, S.; BOSCH, J.; LACY, A. M.; VISA, J. Effects of carbon dioxide vs helium pneumoperitoneum on hepatic blood flow. **Surg Endosc**, New York, v.12, p.1121-1125, 1998.
80. SALGADO JR, W.; CUNHA, F. Q., SANKARANKUTY, A. S.; SANTOS, J. S. Desenvolvimento de modelo de peritonite bacteriana para avaliação do tratamento mediante acesso laparotômico e video-laparoscópico. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v.16, n.1, p.9-12, 2001.
81. SANTOS, L.S.; TAMBARA FILHO, R.; FIGUEIREDO, T.M.S.; CRAVO, G. Effects of the pneumoperitoneum in rats submitted to a unilateral nephrectomy, morphologic and functional study on the remnant kidney. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v.20, n.3, p.195-199, 2005.
82. SCHILLING, M.K.; REDAELLI, C.; KRÄHENBÜHL, L.; SIGNER, C.; BUCHLER, M.W. Splanchnic microcirculatory changes during CO<sub>2</sub> laparoscopy. **J Am Coll Surg**, Chicago, v.184, p.378-382, 1997.
83. SILVA, E.; PEDRO, M.A.; SOGAYAR, A.C.B. *et al.* Brazilian Sepsis Epidemiological Study , BASES study). **Crit Care**, London, v.8, p.251-260, 2004.
84. SMEDEEGARD, G.; CUI, L.X.; HUGLI, T.E. Endotoxin-induced shock in the rat. A role for C5a. **Am J Pathol**, Bethesda, v.135, n.3, p.489-497, 1989.
85. SPRONG, R.C.; AARSMAN, C.J.; VAN OIRSCHOT, J.F.; VAN ASBECK, B.S. Dimethylthiourea protects rats against gram-negative sepsis and decreases tumor necrosis factor and nuclear factor kappa $\beta$  activity. **J Lab Clin Med**, St. Louis, v.129, n.4, p.470-481, 1997.
86. TIZARD, I.R. Macrófagos: a segunda população de células fagocíticas. In: \_\_\_\_\_ **Imunologia Veterinária: uma introdução**. 5. ed. São Paulo, Rocca, p.32-44, 1998.
87. UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ. Biblioteca Central. **Normas para apresentação de documentos científicos**. Curitiba, Editora da UFPR, volume 2, 2007.
88. VOLZ, J.; KOSTER, S.; SPACEK, Z.; PAWELETZ. Characteristic alterations of the peritoneum after carbon dioxide pneumoperitoneum. **Surg Endosc**, New York, v.13, n.6, p.611-614. 1999.
89. WALKER, W.F.; HOMBERGER, D.G. **Anatomy and Dissection of Rat**. 3. ed. New York, W.H. Freeman and Company, p.15-17. 1997.
90. WARREN, H.S. Toll-like receptors. **Crit Care Med**, New York, v.33 , n.12, p.457-459, 2005.
91. WINDBERGER, U. B.; AUER, R.; KEPLINGER, F.; LANGLE, F.; HEINZE, G.; SCHINDL, M.; LOSERT, M. The role of intra-abdominal pressure on splanchnic and pulmonary hemodynamic and metabolic changes during carbon dioxide pneumoperitoneum. **Gastrointest Endosc**, Denver, v.49, n.1, p.84-91, 1999.



---

**ANEXO 1- PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM ANIMAIS****HOSPITAL E MATERNIDADE ANGELINA CARON**  
**Coordenação de Ensino e Pesquisa**  
**Comitê de Ética em Pesquisa em Animais**

---

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto (protocolo 018/2004 de 23 de janeiro de 2004), intitulado "Efeitos do pneumoperitônio em ratos na vigência de endotoxemia" de autoria do Dr. Matheus Martin Macri, por estar de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais deste hospital, foi aprovado em reunião do CEPA de 04 de fevereiro de 2004.

Campina Grande do Sul, 05 de fevereiro de 2004

Dr. Carlos José Franco de Souza  
Presidente do Comitê – CEPA/HAC

---

## ANEXO 2- OBTENÇÃO DOS VALORES INICIAIS NAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS

Ratos	<b>Creatinina</b>	Uréia	BD	BT	ALT	AST	TAP	LPS	IL6	TNF $\alpha$
1	0,55	42	0,28	0,49	49	123	15,5	0	6,5	0
2	0,60	36	0,18	0,24	41	140	15,6	0	10,4	0
3	0,56	32	0,11	0,13	36	116	15,4	0	0	5,4
4	0,48	44	0,19	0,3	41	112	15,8	0	7,1	0
5	0,88	20	0,23	0,35	36	93	16,7	0	6,2	0
6	0,61	39	0,14	0,22	67	103	18,1	0	6,3	6,6
7	0,70	39	0,22	0,4	74	213	15,9	0	0	8,2
8	0,61	40	0,6	0,9	72	150	15,7	0	11	11,7
9	0,45	49	0,21	0,49	41	122	14,3	0	0	14,3
10	0,71	41	0,18	0,3	49	125	14,9	0	7,7	0
11	0,66	39	0,23	0,44	35	116	15	0	7,4	0
12	0,58	41	0,19	0,3	42	113	14,3	0	9,1	0
13	0,78	29	0,14	0,35	35	108	14,5	0	7,5	0
14	0,81	35	0,14	0,22	66	98	15,2	0	0	0
15	0,42	38	0,22	0,4	72	124	16,2	0	6,1	0
16	0,51	45	0,6	0,9	74	109	12,4	0	8	0
17	0,88	22	0,14	0,3	35	103	15,9	0	0	11,5
18	0,61	41	0,22	0,44	42	213	14,3	0	8,2	7,8
19	0,65	39	0,21	0,3	35	122	14,9	0	6,6	8,4
20	0,45	29	0,18	0,35	66	125	15	0	6,3	0
21	0,74	35	0,18	0,22	72	116	14,3	0	0	0
22	0,66	38	0,23	0,44	35	116	14,9	0	0	0
23	0,56	45	0,19	0,3	42	113	14,3	0	0	0
24	0,65	29	0,14	0,35	35	108	1,45	0	8,1	0
25	0,45	39	0,14	0,3	35	109	15,9	0	10,5	0
26	0,74	29	0,22	0,44	66	103	14,3	0	0	0
27	0,66	35	0,58	0,9	72	213	14,9	0	7,7	6,3
28	0,56	38	0,14	0,3	35	213	14,3	0	9,6	0
29	0,65	45	0,22	0,44	42	122	1,45	0	0	0
30	0,88	29	0,21	0,3	35	125	14,3	0	0	5,2
31	0,61	22	0,19	0,35	35	116	14,3	0	0	0
32	0,65	41	0,14	0,22	35	108	13,8	0	0	0
<b>M</b>	<b>0,63</b>	<b>36,41</b>	<b>0,22</b>	<b>0,39</b>	<b>48,34</b>	<b>127,81</b>	<b>14,18</b>		<b>4,70</b>	<b>2,67</b>
<b>DP</b>	<b>0,13</b>	<b>7,17</b>	<b>0,13</b>	<b>0,19</b>	<b>15,48</b>	<b>34,57</b>	<b>3,49</b>		<b>4,12</b>	<b>4,34</b>

### Legenda:

BD : bilirrubina direta, BT : bilirrubina total, ALT : alanina aminotransferase, AST : aspartato aminotransferase, TAP : tempo de ação da protrombina, M : média, DP : desvio padrão.



**ANEXO 3- OBTENÇÃO DOS VALORES INICIAIS DAS CONTAGENS HEMATOLÓGICAS**

Rato	Plaquetas	Leucócitos	Bastonetes
1	339000	5400	4
2	365000	6300	3
3	291000	4500	0
4	384000	3000	0
5	357000	3700	2
6	368000	3600	1
7	599000	3900	0
8	356000	4900	0
9	333000	4300	0
10	422000	4500	2
11	355000	3460	0
12	156800	7700	0
13	337000	5600	0
14	425000	3000	1
15	243000	8700	2
16	316000	8700	0
17	475000	10800	0
18	381000	4980	0
19	594000	11300	0
20	457500	4500	6
21	323000	3050	3
22	642000	7500	0
23	436000	6110	0
24	264000	3700	0
25	321000	13600	0
26	658000	3400	0
27	536300	3700	1
28	562000	4900	5
29	549000	5300	0
30	445000	8700	0
31	427000	8700	0
32	433000	10800	0
<b>M</b>	<b>410956,25</b>	<b>5409,69</b>	<b>0,94</b>
<b>DP</b>	<b>118454,96</b>	<b>2239,05</b>	<b>1,63</b>

**Legenda:**

M : média, DP : desvio padrão.

#### ANEXO 4- RESULTADOS OBTIDOS NAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS NO GRUPO CONTROLE SUBMETIDO AO PNEUMOPERITÔNIO POR UMA HORA A 10mmHg

Rato	Creatinina	Uréia	BD	BT	ALT	AST	TAP	LPS	IL6	TNF $\alpha$
1	0,51	62	0,15	0,29	158	787	15,4	0	7,5	8,6
2	0,78	93	0,16	0,25	236	960	16,5	0	6,4	6,4
3	0,63	70	0,16	0,32	180	876	16,9	0	8,8	11,1
4	0,59	89	0,33	0,64	137	557	16,6	0	0	16,0
5	0,43	35	0,19	0,3	93	383	16,1	0	10,3	7,3
6	0,51	49	0,15	1,18	101	227	16,0	0	6,1	0
7	0,55	69	0,14	0,48	47	214	14,6	0	0	5,9
8	0,59	55	0,11	0,24	98	249	15,9	0	0	9,1
<b>M</b>	<b>0,57</b>	<b>65,25</b>	<b>0,17</b>	<b>0,46</b>	<b>131,25</b>	<b>531,63</b>	<b>16,0</b>		<b>4,89</b>	<b>8,05</b>
<b>DP</b>	<b>0,10</b>	<b>19,51</b>	<b>0,07</b>	<b>0,32</b>	<b>59,38</b>	<b>307,90</b>	<b>0,73</b>		<b>4,26</b>	<b>4,58</b>

**Legenda:**

**BD** : bilirrubina direta, **BT** : bilirrubina total, **ALT** : alanina aminotransferase, **AST** : aspartato aminotransferase, **TAP** : tempo de ação da protrombina, **M** : média, **DP** : desvio padrão.

#### ANEXO 5- RESULTADOS OBTIDOS NAS CONTAGENS HEMATOLÓGICAS NO GRUPO CONTROLE SUBMETIDO AO PNEUMOPERITÔNIO POR UMA HORA A 10mmHg

Rato	Plaquetas	Leucócitos	Bastonetes
1	338100	5300	4
2	335000	4150	3
3	357000	3700	2
4	333000	4300	0
5	422000	4500	2
6	355000	3460	2
7	156800	3700	0
8	337000	3600	0
<b>M</b>	<b>329237,50</b>	<b>5130,00</b>	<b>1,63</b>
<b>DP</b>	<b>75555,28</b>	<b>1141,55</b>	<b>1,51</b>

**Legenda:**

**M** : média, **DP** : desvio padrão.

### ANEXO 6- RESULTADOS DAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS OBTIDOS NO GRUPO CONTROLE SUBMETIDO À INOCULAÇÃO DE LPS E MANTIDOS POR 4 HORAS

Rato	Creatinina	Uréia	BD	BT	ALT	AST	TAP	LPS	IL6	TNF $\alpha$
1	0,73	62	0,16	0,32	128	325	16,8	0,039	12,6	73,5
2	1,29	70	0,32	0,71	241	288	17,1	0,156	14,2	32,4
3	0,66	89	0,22	0,48	162	418	16,7	0,156	10,4	51,1
4	0,76	93	0,17	0,95	132	358	15,2	0,039	13,8	39,0
5	0,84	35	0,27	0,64	96	254	15,9	0,039	11,3	34,2
6	0,72	55	0,12	0,28	85	327	16,3	0,156	9,2	28,6
7	0,87	69	0,21	0,36	69	242	17,4	0,156	12,0	34,8
8	0,65	49	0,21	0,41	74	195	18,2	0,156	17,1	46,3
<b>M</b>	<b>0,82</b>	<b>63,12</b>	<b>0,21</b>	<b>0,52</b>	<b>123,38</b>	<b>300,88</b>	<b>16,70</b>	<b>0,11</b>	<b>12,58</b>	<b>42,49</b>
<b>DP</b>	<b>0,21</b>	<b>15,22</b>	<b>0,06</b>	<b>0,23</b>	<b>57,37</b>	<b>71,00</b>	<b>0,92</b>	<b>0,06</b>	<b>2,47</b>	<b>14,57</b>

**Legenda:**

**BD** : bilirrubina direta, **BT** : bilirrubina total, **ALT** : alanina aminotransferase, **AST** : aspartato aminotransferase, **TAP** : tempo de ação da protrombina, **M** : média, **DP** : desvio padrão.

### ANEXO 7- RESULTADOS DAS CONTAGENS HEMATOLÓGICAS OBTIDOS NO GRUPO CONTROLE SUBMETIDO À INOCULAÇÃO DE LPS E MANTIDOS POR 4 HORAS

Rato	Plaquetas	Leucócitos	Bastonetes
1	345000	3000	8
2	427000	3700	3
3	233000	3600	3
4	376000	3030	11
5	313000	3700	6
6	356000	3600	4
7	145000	3900	8
8	334000	2900	6
<b>M</b>	<b>316125,00</b>	<b>5047,50</b>	<b>6,13</b>
<b>DP</b>	<b>88499,29</b>	<b>1827,17</b>	<b>2,80</b>

**Legenda:**

**M** : média, **DP** : desvio padrão.

### ANEXO 8- RESULTADOS OBTIDOS DAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS NO GRUPO CONTROLE SUBMETIDO À INOCULAÇÃO DE LPS POR E MANTIDOS POR 11 HORAS

Rato	Creatinina	Uréia	BD	BT	ALT	AST	TAP	LPS	IL6	TNF $\alpha$
1	0,83	168	0,42	0,98	839	1246	17,7	0,156	8,5	367,8
2	1,29	194	0,35	0,85	170	457	18,1	0,039	0	117,1
3	0,66	115	0,13	0,22	190	1471	18,8	0,039	9,6	354,0
4	0,51	42	0,21	0,36	225	827	14,8	0,156	5,4	401,3
5	0,62	101	0,21	0,41	132	657	17,3	0,156	8,1	276,6
6	0,98	177	0,19	0,25	518	1266	20,3	0,156	11,3	236,4
7	0,55	56	0,14	0,27	161	540	14	0,156	7,2	326,0
8	0,44	42	0,26	0,45	198	686	15,1	0,156	12,5	461,1
<b>M</b>	<b>0,74</b>	<b>111,88</b>	<b>0,24</b>	<b>0,47</b>	<b>304,13</b>	<b>893,75</b>	<b>17,01</b>	<b>0,13</b>	<b>7,83</b>	<b>317,54</b>
<b>DP</b>	<b>0,28</b>	<b>62,28</b>	<b>0,10</b>	<b>0,29</b>	<b>247,99</b>	<b>380,87</b>	<b>2,18</b>	<b>0,05</b>	<b>3,88</b>	<b>106,90</b>

**Legenda:**

BD : bilirrubina direta, BT : bilirrubina total, ALT : alanina aminotransferase, AST : aspartato aminotransferase, TAP : tempo de ação da protrombina, M : média, DP : desvio padrão.

### ANEXO 9- RESULTADOS OBTIDOS DAS CONTAGENS HEMATOLÓGICAS NO GRUPO CONTROLE SUBMETIDO À INOCULAÇÃO DE LPS POR E MANTIDOS POR 11 HORAS

Rato	Plaquetas	Leucócitos	Bastonetes
1	125000	3000	23
2	243000	5100	18
3	116000	6100	31
4	275000	4210	50
5	142000	3200	28
6	212000	5400	11
7	147500	7400	24
8	210000	5200	17
<b>M</b>	<b>183812,50</b>	<b>5370,00</b>	<b>25,25</b>
<b>DP</b>	<b>59067,72</b>	<b>1296,78</b>	<b>11,85</b>

**Legenda:**

M : média, DP : desvio padrão.

### ANEXO 10- RESULTADOS OBTIDOS DAS DOSAGENS BIOQUÍMICAS NO GRUPO EXPERIMENTO SUBMETIDO À INOCULAÇÃO DE LPS E PNEUMOPERITÔNIO

Rato	Creatinina	Uréia	BD	BT	ALT	AST	TAP	LPS	IL6	TNF $\alpha$
1	0,83	87	0,4	0,29	840	1417	20	0,156	18,5	671,9
2	0,7	109	0,25	0,55	133	875	24	0,156	26,4	876,4
3	1,41	164	0,34	0,49	262	699	19,7	0,313	31,1	234,1
4	0,76	129	0,29	0,81	140	478	21,9	0,156	46,2	498,3
5	0,84	117	0,31	0,62	314	781	21,8	0,156	53,0	619,0
6	0,63	36	0,45	0,31	131	398	20,2	0,156	38,9	347,5
7	0,72	87	0,23	0,36	258	633	23,2	0,313	31,6	512,7
8	0,87	122	0,45	0,40	1045	564	20,02	0,313	42,3	387,0
<b>M</b>	<b>0,85</b>	<b>106,38</b>	<b>0,34</b>	<b>0,48</b>	<b>390,38</b>	<b>730,63</b>	<b>21,35</b>	<b>0,21</b>	<b>36,0</b>	<b>518,36</b>
<b>DP</b>	<b>0,24</b>	<b>37,61</b>	<b>0,09</b>	<b>0,18</b>	<b>351,88</b>	<b>317,86</b>	<b>1,63</b>	<b>0,08</b>	<b>11,23</b>	<b>203,39</b>

**Legenda:**

BD : bilirrubina direta, BT : bilirrubina total, ALT : alanina aminotransferase, AST : aspartato aminotransferase, TAP : tempo de ação da protrombina, M : média, DP : desvio padrão.

### ANEXO 11- RESULTADOS OBTIDOS DAS CONTAGENS HEMATOLÓGICAS NO GRUPO EXPERIMENTO SUBMETIDO À INOCULAÇÃO DE LPS E PNEUMOPERITÔNIO

Rato	Plaquetas	Leucócitos	Bastonetes
1	136000	9300	10
2	211000	14200	15
3	125000	12600	15
4	198000	10600	22
5	173000	15400	39
6	185000	12500	15
7	138000	19800	10
8	355000	13460	23
<b>M</b>	<b>190,125</b>	<b>13482,50</b>	<b>18</b>
<b>DP</b>	<b>73.571</b>	<b>3199,31</b>	<b>9,51</b>

**Legenda:**

M : média, DP : desvio padrão.

## ANEXO 12- AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS

Aferição	Grupo		Grupo	Valor de p
Creatinina	Referência	X	C-PP	0,2123
		X	<b>C-LPS4</b>	<b>0,0029</b>
		X	C-LPS11	0,1357
		X	<b>E</b>	<b>0,0013</b>
	C-PP	X	<b>C-LPS4</b>	<b>0,0106</b>
		X	C-LPS11	0,1547
		X	<b>E</b>	<b>0,0114</b>
	C-LPS4	X	C-LPS11	0,5308
		X	E	0,7938
	C-LPS11	X	E	0,4192
Uréia	Referência	X	C-PP	<b>0,0000</b>
		X	C-LPS4	<b>0,0000</b>
		X	C-LPS11	<b>0,0000</b>
		X	<b>E</b>	<b>0,0000</b>
	C-PP	X	C-LPS4	1,0000
		X	C-LPS11	0,0629
		X	<b>E</b>	<b>0,0158</b>
	C-LPS4	X	C-LPS11	0,0629
		X	<b>E</b>	<b>0,0158</b>
	C-LPS11	X	E	0,8338
Bilirrubina Direta	Referência	X	C-PP	0,2805
		X	C-LPS4	0,7532
		X	C-LPS11	0,7724
		X	<b>E</b>	<b>0,0198</b>
	C-PP	X	C-LPS4	0,2844
		X	C-LPS11	0,1513
		X	<b>E</b>	<b>0,0007</b>
	C-LPS4	X	C-LPS11	0,5059
		X	E	0,0039
	C-LPS11	X	E	0,0483
Bilirrubina Total	Referência	X	C-PP	0,3871
		X	C-LPS4	0,0982
		X	C-LPS11	0,3012
		X	<b>E</b>	<b>0,3012</b>
	C-PP	X	C-LPS4	0,6929
		X	C-LPS11	0,9419
		X	<b>E</b>	<b>0,9018</b>
	C-LPS4	X	C-LPS11	0,7340
		X	E	0,7030
	C-LPS11	X	E	0,9670
Aspartato Aminotransferase	Referência	X	C-PP	<b>0,0000</b>
		X	C-LPS4	<b>0,0000</b>
		X	C-LPS11	<b>0,0000</b>
		X	<b>E</b>	<b>0,0000</b>
	C-PP	X	C-LPS4	0,0579
		X	C-LPS11	0,0552
		X	<b>E</b>	<b>0,2241</b>
	C-LPS4	X	C-LPS11	<b>0,0007</b>
		X	<b>E</b>	<b>0,0022</b>
	C-LPS11	X	E	0,3681
Alanina Aminotransferase	Referência	X	C-PP	<b>0,0000</b>
		X	C-LPS4	<b>0,0000</b>
		X	C-LPS11	<b>0,0000</b>
		X	<b>E</b>	<b>0,0000</b>
	C-PP	X	C-LPS4	0,7913
		X	C-LPS11	0,0758
		X	<b>E</b>	<b>0,0592</b>
	C-LPS4	X	C-LPS11	0,0643
		X	E	0,0525
	C-LPS11	X	E	0,5799
Tempo de Ação da Protrombina	<sup>3</sup> Referência	X	C-PP	0,1543
		X	C-LPS4	0,0519
		X	C-LPS11	<b>0,0355</b>
		X	<b>E</b>	<b>0,0355</b>

<sup>3</sup> Continua a tabela

	C-PP	X	C-LPS4	0,1151
		X	C-LPS11	0,2341
		X	E	<b>0,0000</b>
	C-LPS4	X	C-LPS11	0,7148
		X	E	<b>0,0000</b>
	C-LPS11	X	E	<b>0,0005</b>
<b>Endotoxina</b>	Referência	X	C-PP	Não se aplica
		X	C-LPS4	Não se aplica
		X	C-LPS11	Não se aplica
		X	E	Não se aplica
	C-PP	X	C-LPS4	Não se aplica
		X	C-LPS11	Não se aplica
		X	E	Não se aplica
	C-LPS4	X	C-LPS11	0,6186
		X	E	<b>0,0124</b>
	C-LPS11	X	E	<b>0,0230</b>
<b>Interleucina 6</b>	Referência	X	C-PP	0,9080
		X	C-LPS4	<b>0,0000</b>
		X	C-LPS11	0,0596
		X	E	<b>0,0000</b>
	C-PP	X	C-LPS4	<b>0,0006</b>
		X	C-LPS11	0,1709
		X	E	<b>0,0000</b>
	C-LPS4	X	C-LPS11	<b>0,0111</b>
		X	E	<b>0,0000</b>
	C-LPS11	X	E	<b>0,0000</b>
<b>Fator de Necrose Tumoral Alfa</b>	Referência	X	C-PP	<b>0,0036</b>
		X	C-LPS4	<b>0,0000</b>
		X	C-LPS11	<b>0,0000</b>
		X	E	<b>0,0000</b>
	C-PP	X	C-LPS4	<b>0,0000</b>
		X	C-LPS11	<b>0,0000</b>
		X	E	<b>0,0000</b>
	C-LPS4	X	C-LPS11	<b>0,0000</b>
		X	E	<b>0,0000</b>
	C-LPS11	X	E	<b>0,0269</b>
<b>Leucócitos</b>	Referência	X	C-PP	0,7357
		X	C-LPS4	0,6751
		X	C-LPS11	0,9621
		X	E	<b>0,0000</b>
	C-PP	X	C-LPS4	0,9153
		X	C-LPS11	0,7003
		X	E	<b>0,0000</b>
	C-LPS4	X	C-LPS11	0,6901
		X	E	<b>0,0000</b>
	C-LPS11	X	E	<b>0,0000</b>
<b>Bastonetes</b>	Referência	X	C-PP	0,2850
		X	C-LPS4	<b>0,0000</b>
		X	C-LPS11	<b>0,0000</b>
		X	E	<b>0,0000</b>
	C-PP	X	C-LPS4	<b>0,0013</b>
		X	C-LPS11	<b>0,0001</b>
		X	E	<b>0,0002</b>
	C-LPS4	X	C-LPS11	<b>0,0006</b>
		X	E	<b>0,0031</b>
	C-LPS11	X	E	0,2380
<b>Plaquetas</b>	Referência	X	C-PP	0,0722
		X	C-LPS4	<b>0,0412</b>
		X	C-LPS11	<b>0,0000</b>
		X	E	<b>0,0000</b>
	C-PP	X	C-LPS4	0,7546
		X	C-LPS11	<b>0,0007</b>
		X	E	<b>0,0022</b>
	C-LPS4	X	C-LPS11	<b>0,0034</b>
		X	E	<b>0,0079</b>
	C-LPS11	X	E	0,8526