

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

João Carlos Domingues Repka

**EFEITOS DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA
PELA ENDOTOXINA DE *Escherichia coli* NA
CICATRIZAÇÃO COLÔNICA EM RATOS WISTAR.**

Curitiba
2009

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

João Carlos Domingues Repka

**EFEITOS DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA
PELA ENDOTOXINA DE *Escherichia coli* NA
CICATRIZAÇÃO COLÔNICA EM RATOS WISTAR.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Clínica Cirúrgica.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Coordenador: Prof. Dr. Antonio Carlos Ligocki Campos

Curitiba
2009

João Carlos Domingues Repka
Efeitos da reação inflamatória induzida pela endotoxina de *Escherichia coli* na cicatrização colônica em ratos wistar / João Carlos Domingues Repka. Curitiba, 2009.
102 f.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências da Saúde. Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica.

1. Lipopolissacarídeo (endotoxina). 2. Cicatrização de Feridas. 3. Hidroxiprolina. 4. Fator de Necrose tumoral alfa. 5. Sepse. 6. PCNA. 7. Colágeno. 8. Ratos Wistar. 9. Intestinos. I. Título. II. Matias, Jorge Eduardo Fouto .

“... Cultivem o espírito crítico.
Se deixado de lado, ele não desperta idéias, nem
estimula a grandes coisas.
Sem ele, nada tem valor.
Ele tem sempre a última palavra.
Isso que lhes peço é o que, por sua vez, vocês devem
pedir aos discípulos que vão formar, é o que há
de mais difícil para o pesquisador.
Acreditar que se encontrou um fato científico
importante, sentir um desejo ardente de anunciá-
lo, e ser obrigado durante dias, semanas e até
durante anos a combater a si próprio, esforçando-
se para desmentir suas próprias experiências e só
proclamar sua descoberta quando se esgotarem
todas as hipóteses contrárias, sim, é uma tarefa
árdua.
Porém, quando depois de tantos esforços chega-se,
finalmente à certeza, sentimos uma das maiores
alegrias que a alma humana pode
experimentar...”

Louis Pasteur

... em outra tese eu pensei que o oceano
Atlântico não era suficiente para me separar
de vocês

hoje eu sei que o infinito também não o é

À memória de meus pais.

Agradecimentos

Consigno aqui, cumprindo um dever gratíssimo, os meus agradecimentos a todos aqueles que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste estudo.

- Ao curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, na pessoa do Professor Doutor Jorge Eduardo Fouto Matias pelo estímulo e pela acolhida como aluno regular do programa de Doutorado em Clínica Cirúrgica;
- Ao Hospital Angelina Caron, pela viabilização das condições para execução deste estudo;
- Ao Doutor Carlos José Franco de Souza pelo precioso auxílio nos procedimentos cirúrgicos;
- Aos médicos residentes do serviço de Cirurgia Geral do Hospital e Maternidade Angelina Caron, Doutor Marcus Vinicius Thomé Nora Guimarães e Doutora Patrícia M.Mellek pelo auxílio nas diversas etapas;
- À Bibliotecária Áurea Costin, da biblioteca da Universidade Federal do Paraná pela revisão das normas de apresentação;
- À Professora Márcia Ulandoski, pela orientação estatística;
- A todos os meus alunos e alunas, fontes de estímulo para o meu aprimoramento profissional;

Muito obrigado.

RESUMO

Introdução: A deiscência de anastomoses intestinais constitui um dos graves problemas nas intervenções cirúrgicas, com elevadas taxas de morbi-mortalidade. A reação inflamatória sistêmica secundária à endotoxemia, envolvendo mediadores imunológicos indutores de alterações metabólicas podem alterar o curso natural da cicatrização.

Objetivos: Avaliar os efeitos da endotoxemia induzida nas fases pré, pós e pré/pós-cirúrgicas, ao sétimo dia de evolução da cicatrização colônica, tendo como indicadores o estado endotóxico e a evolução cicatrização. **Método:** Foram utilizados 70 ratos Wistar, com pesos de $142,57 \pm 11,51$ gramas, separados em grupo controle ($n = 10$) e três grupos com indução de endotoxemia por sete dias, pré-operatório ($n = 20$), pós-operatório ($n = 20$) e pré / pós-operatório ($n = 20$). Cada grupo continha os sub-grupos LPS e SF. O LPS recebia 1mg/kg/dia de lipopolissacarídeo, durante sete dias, de acordo com o tempo e o SF recebia solução fisiológica. Ao sétimo dia, todos os ratos foram submetidos à colotomia transversa e anastomose término-terminal em plano único total com a síntese interrompida. Ao sétimo dia da colotomia, foram coletadas amostras de sangue e do tecido do cólon que continha a cicatriz. O estado endotóxico foi avaliado por determinações hematológicas, renal e hepática, determinações do nível sérico de endotoxinas circulantes e do fator de necrose tumoral α (TNF α). A cicatrização do cólon foi avaliada pela dosagem de hidroxiprolina, pela determinação da porcentagem de colágenos tipo I e III, a porcentagem do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) por método imunocitoquímico e também a formação do tecido de granulação. Os resultados foram comparados estatisticamente pelo teste t-Student e ANOVA, ambos com significância estatística de 0,05. **Resultados:** O estado endotóxico foi significativamente mais grave nos sub-grupos LPS dos grupos endotoxemia pré/pós e pós-cirúrgica, em comparação aos sub-grupos SF e LPS do grupo pré-cirúrgica. Nesta mesma ordem dos grupos, ocorreram os resultados obtidos das avaliações da endotoxemia e da liberação de TNF α , as determinações de hidroxiprolina, colágeno maduro e PCNA foram significativamente menores bem como a reepitelização e a formação de tecido de granulação. **Conclusão:** A endotoxemia induzida na fase pré-cirúrgica causou: perda ponderal, aumento dos níveis de endotoxina e de TNF α , alteração da função renal, piora do padrão cicatricial caracterizada pela diminuição da viabilidade celular, da quantidade de colágeno maduro, aumento do colágeno imaturo. Nas fases pós-cirúrgica e pré/pós cirúrgicas: perda ponderal, níveis séricos elevados de endotoxina e TNF α , alterações hematológicas e das funções hepática e renal, piora do padrão cicatricial caracterizada pela diminuição da quantidade de hidroxiprolina tecidual, viabilidade celular, tecido de granulação, diminuição de colágeno maduro e aumento do colágeno imaturo.

Descritores: Sepses, Endotoxemia; Cicatrização intestinal; Hidroxiprolina; Fator de necrose tumoral alfa; Lipopolissacarídeo; PCNA; Colágeno; Ratos Wistar;

ABSTRACT

Introduction: The dehiscence of intestinal anastomosis is one of the most serious problems in surgical intervention with high rates of morbi-mortality. The secondary systemic inflammatory reaction to the endotoxemia, involving immunological mediators that induce metabolic alterations can alter the natural course of the healing. **Aims:** To evaluate the effects of endotoxemia induced at the pre, post and pre and post surgery phases, on the seventh day of colonic healing by evaluating the endotoxic state how far the healing process. **Method:** 70 Wistar rats were used, each weighting 142.57 ± 11.51 grams, separated into the control group (n=10) and three groups induced with endoxemia for seven days, pre-surgery (n=20), post-surgery (n=20) and pre/post surgery (n=20). Each group contained the LPS and SF sub-groups. The LPS received 1mg/kg/day, for seven days, according to the time and the SF received physiological serum. On the seventh day, all the rats were submitted to transverse colostomy and termino-terminal anastomosis on a single plane with interrupted synthesis. On the seventh day of the colostomy, a blood sample was taken of the rats and the colonic tissue was removed. The endotoxic state was evaluated by the hematological, renal and liver determinations of the serum levels of circulating endotoxin and the tumor necrosis factor alpha (TNF α). The colonic healing was evaluated by the dosage of tissue hydroxyproline, by the determining the percentage of type I and type III collagen, by the immunocytochemical evaluation of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and also by the evaluation of the granulation tissue. The results were evaluated statistically using the t-Student and ANOVA tests, both with a statistical significance of 0.05. **Results:** The endotoxic state of the rats in the LPS sub-groups and the pre/post and post-colotomy group was significantly more serious than the pre-colotomy group and the SF sub-groups. In this same order of the groups, the anastomotic area had worse results in the determination of tissue hydroxyproline, percentage of mature collagen, cellular viability, reepithelization and formation of granulation tissue. **Conclusion:** The endotoxemia induced in the pre-surgical phase caused: weight loss, an increase in the levels of endotoxin and TNF α , worsening of the renal function and healing process characterized by decreased cellular viability, a reduction in the amount of mature collagen and an increase in the amount of immature collagen. In both the post and pre/post surgical phases, the endotoxemia induced: weight loss, increased levels of endotoxin and TNF α , changes in hematologic, renal and hepatic functions, worsening of the healing process characterized by decreased hydroxyproline tissue content, cellular viability, formation of granulation tissue, decreased mature collagen and increased immature collagen.

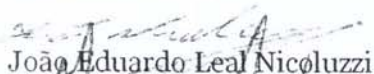
Key words: Sepsis, Endotoxemia; Intestinal healing; Hydroxyproline; Tumor necrosis factor alpha; Lipopolysaccharide; PCNA; Collagen; Wistar rats;



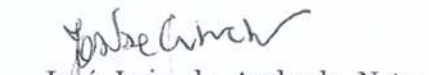
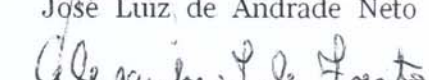
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEIS: MESTRADO E DOUTORADO

Ata do julgamento da 127ª Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno **JOÃO CARLOS DOMINGUES REPKA** sob o Título EFEITOS DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA ENDOTOXINA DE *ESCHERICHIA COLI* NA CICATRIZAÇÃO COLÔNICA EM RATOS WISTAR, na **Linha de Pesquisa:** CICATRIZAÇÃO E MEDIDAS DE RESISTÊNCIA DOS TECIDOS, **Área de Concentração:** NUTRIÇÃO E CICATRIZAÇÃO EM CIRURGIA, tendo como orientador Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias.

Às sete horas e trinta minutos do dia onze de setembro de dois mil e nove, no Auditório do 7º andar do prédio central sala 701 do Hospital de Clínicas, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos Professores Doutores João Eduardo Leal Nicoluzzi, José Luiz de Andrade Neto, Marco Aurélio Raeder da Costa, Alexandre Coutinho Teixeira de Freitas e Henrique Jorge Stahlke Júnior sendo este último Presidente da Banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias, Vice-Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da tese, como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua tese no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. O candidato foi **APROVADO** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que será assinada pelos seguintes componentes da Banca Examinadora.


João Eduardo Leal Nicoluzzi


Marco Aurélio Raeder da Costa


José Luiz de Andrade Neto

Alexandre C. Teixeira de Freitas


Henrique Jorge Stahlke Júnior



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA
DA AVALIAÇÃO DA DEFESA DE DOUTORADO**

Aluno **JOÃO CARLOS DOMINGUES REPKA**

Título da Tese: EFEITOS DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA INDUZIDA PELA
ENDOTOXINA DE *ESCHERICHIA COLI* NA CICATRIZAÇÃO COLÔNICA EM
RATOS WISTAR.

CONCEITOS EMITIDOS:

Prof. Dr. João Eduardo Leal Nicoluzzi	conceito emitido	A	equivalência	10,0
Prof. Dr. José Luiz de Andrade Neto	conceito emitido	A	equivalência	10,0
Prof. Dr. Marco Aurélio Raeder da Costa	conceito emitido	A	equivalência	10,0
Prof. Dr. Alexandre C. T. de Freitas	conceito emitido	A	equivalência	10,0
Prof. Dr. Henrique Jorge Stahlke Júnior	conceito emitido	A	equivalência	10,0

Conceito Final de Avaliação:

Conceito: A Equivalência: 10,0

Curitiba, 11 de setembro de 2009.

João Eduardo Leal Nicoluzzi

José Luiz de Andrade Neto

Marco Aurélio Raeder da Costa

Alexandre C. T. de Freitas

Henrique Jorge Stahlke Júnior

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DIAGRAMA DA ULTRAESTRUTURA DO REVESTIMENTO DA ESCHERICHIA COLI DESTACANDO O LPS E SEUS DOMÍNIOS	5
FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS EVENTOS ENVOLVIDOS APÓS O ESTÍMULO PELA ENDOTOXINA. "O LPS DA SUPERFÍCIE DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS É LIBERADO E LIGA-SE AO RECEPTOR ESPECÍFICO LBP FORMANDO UM COMPLEXO. ESSE COMPLEXO LIGA-SE AOS RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CD14 E TLR-4 DOS MACRÓFAGOS RESULTANDO NA ATIVAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DE SINALIZAÇÕES MOLECULARES INTRA-CITOPLASMÁTICAS	6
FIGURA 3 - DIAGRAMA REPRESENTATIVO DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS PELO LPS E TRANSCRIÇÃO DO FATOR NF κ B COM CONSEQUENTE LIBERAÇÃO DE TNF- α , IL1 β , IL2 E IL-6	8
FIGURA 4 - GRÁFICO ESQUEMÁTICO DA CINÉTICA DA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS EM VIGÊNCIA DE SEPSE	9
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS FASES EVOLUTIVAS DA CICATRIZAÇÃO	18
FIGURA 6 - ASPECTO ILUSTRATIVO DA INOCULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE LPS POR VIA ENDOVENOSA, ATRAVÉS DA VEIA DORSAL PENIANA	26
FIGURA 7 - ASPECTO ILUSTRATIVO DAS PRINCIPAIS ETAPAS DA COLOTOMIA. (A) INDUÇÃO ANESTÉSICA POR VIA INTRA-MUSCULAR. (B) TRICOTOMIA E FIXAÇÃO NO ANIMAL NA MESA CIRÚRGICA. (C) DEGERMAÇÃO DA ÁREA ABDOMINAL. (D) INCISÃO ABDOMINAL MEDIANA DE CERCA DE TRÊS CENTÍMETROS DE EXTENSÃO (E) SECÇÃO A COMPLETA DO CÓLON E ANASTOMOSE TÉRMINO-TERMINAL, COM OITO PONTOS SEPARADOS COM FIO MONOFILAMENTAR (F) FECHAMENTO DA PAREDE ABDOMINAL FOI FEITO COM SUTURA CONTÍNUA COM FIO MONOFILAMENTAR DE NYLON 3.0 EM DOIS PLANOS.....	27
FIGURA 8 - ASPECTO ILUSTRATIVO DOS RATOS DO GRUPO ENDOTOXEMIA PRÉ E PÓS-CIRÚRGICA, NO D14 DEMONSTRANDO PROSTRAÇÃO E BLEFARITE SANGUINOLENTA	38
FIGURA 9 - CORTE HISTOLÓGICO CORADO PELO MÉTODO SIRIUS RED F3BA (40X) EVIDENCIANDO EM VERMELHO O COLÁGENO TIPO I) E EM AZUL-VERDE O COLÁGENO TIPO III	51
FIGURA 10 - ASPECTO ILUSTRATIVO DE CORTE HISTOLÓGICO DE INTESTINO DE RATO SOB COLORAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA COM PCNA ONDE SE OBSERVAM NÚCLEOS CELULARES DA SUPERFÍCIE EPITELIAL E DAS CRIPTAS DAS GLÂNDULAS, CORADOS DE AZUL, OS QUAIS REPRESENTAM CÉLULAS EM REPOUSO E OS CORADOS EM MARROM, QUE IDENTIFICAM AS CÉLULAS EM PROLIFERAÇÃO DA FASE G1 TARDIA ATÉ A FASE M DA G2	53

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - VARIAÇÃO PONDERAL DOS RATOS DO GRUPO ENDOTOXEMIA PRÉCIRÚRGICA (M±DP - gramas)	36
GRÁFICO 2 - VARIAÇÃO PONDERAL DOS RATOS DO GRUPO ENDOTOXEMIA PÓS-CIRÚRGICA (M±DP - gramas)	37
GRÁFICO 3 - VARIAÇÃO PONDERAL DOS RATOS DO GRUPO ENDOTOXEMIA PRÉ E PÓS-CIRÚRGICA (M±DP - gramas)	38
GRÁFICO 4 - DEMONSTRATIVOS DAS CONTAGENS TOTAIS DE LEUCÓCITOS ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	39
GRÁFICO 5 - DEMONSTRATIVOS DAS CONTAGENS DE PLAQUETAS ($\times 10^3$)/ml .	40
GRÁFICO 6 - DEMONSTRATIVOS DAS CONTAGENS PORCENTUAIS DE BASTONETES	41
GRÁFICO 7 - DEMONSTRATIVO DAS DOSAGENS DE BILIRRUBINAS TOTAIS (mg/dl)	42
GRÁFICO 8 - DEMONSTRATIVO DAS DOSAGENS DOSAGEM DE TGO (U/L)	43
GRÁFICO 9 - DEMONSTRATIVO DAS DOSAGENS DE TGP (U/L)	44
GRÁFICO 10 - DEMONSTRATIVO DA AVALIAÇÃO DO TEMPO DE ATIVAÇÃO DA PROTROMBINA (TAP - segundos)	45
GRÁFICO 11 - DEMONSTRATIVO DAS DOSAGENS DE URÉIA (mg/dl)	46
GRÁFICO 12 - DEMONSTRATIVO DAS DOSAGENS DE CREATININA (mg/dl)	47
GRÁFICO 13 - DEMONSTRATIVO DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINA (LPS - UNIDADES ENDOTÓXICAS /ml - UE/ml)	48
GRÁFICO 14 - DEMONSTRATIVO DAS DOSAGENS DE $\text{TNF}\alpha$ (picogramas/ml)	49
GRÁFICO 15 - DEMONSTRATIVO DAS DOSAGENS TECIDUAIS DE HIDROXIPROLINA (microgramas/mg de tecido intestinal)	50
GRÁFICO 16 - DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES HISTOMÉTRICAS DA MATURAÇÃO DE COLÁGENO EM PORCENTAGEM DE COLÁGENO TIPO III - IMATURO E TIPO I - MADURO	51
GRÁFICO 17 - DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO ENTRE AS PORCENTAGENS OBTIDAS NA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA VIABILIDADE CELULAR DA REEPITELIZAÇÃO CICATRICIAL- CÉLULAS PCNA POSITIVAS	52
GRÁFICO 18 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE $\text{TNF}\alpha$	84

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 - DEMONSTRATIVO DA ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DO ESTUDO E PROCEDIMENTOS REALIZADOS	24
QUADRO 2 - COMPORTAMENTO DAS VARIÁVEIS NOS GRUPOS ENDOTOXEMIA PRÉ, PÓS E PRÉ-PÓS COLOTOMIA EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE	55
QUADRO 3 - GRUPOS EXPERIMENTAIS - PESAGENS DIÁRIAS (gramas)	91
QUADRO 4 - CONTROLE - PESAGENS DIÁRIAS (GRAMAS)	92
TABELA 1 - CRITÉRIOS ADOTADOS PARA AS AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS PELA COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA	33
TABELA 2 - COMPARAÇÕES ENTRE AS PESAGENS (M $\pm$ DP - gramas)	35
TABELA 3 - ESCORES OBTIDOS NA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA PELA HEMATOXILINA E EOSINA DO GRUPO ENDOTOXEMIA PRÉCIRURGICA	54
TABELA 4 - ESCORES OBTIDOS NA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA PELA HEMATOXILINA E EOSINA DO GRUPO ENDOTOXEMIA PRÉ E PÓS - CIRÚRGICA	54
TABELA 5 - ESCORES OBTIDOS NA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA PELA HEMATOXILINA E EOSINA DO GRUPO ENDOTOXEMIA PRÉ E PÓS-CIRÚRGICA	55
TABELA 6 - DILUIÇÕES DA ENDOTOXINA PADRÃO	81
TABELA 7 - PREPARAÇÃO DAS DILUIÇÕES DO PADRÃO DE TNF α PARA CALIBRAÇÃO DO MÉTODO	83

LISTA DE ABREVIATURAS

®	-	Marca registrada
ADP	-	Difosfato de adenosina
AMP	-	Monofosfato de adenosina
ATP	-	Trifosfato de adenosina
CD14	-	Clone de diferenciação 14
COBEA	-	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EDTA	-	Ácido etileno diamino tetra acético
EGF	-	Fator de crescimento epidérmico
EROS	-	Espécies reativas do oxigênio
IF	-	Interferon
IKK	-	I <i>Kappa</i> kinase
IL	-	Interleucina
IRAK	-	Serina-treonina proteína-quinase do receptor de IL-1
LAL	-	Lisado amebóide de <i>Limulus sp</i>
LPS	-	Lipopolissacarídeo - endotoxina
NAD	-	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NDAH	-	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NFκB	-	Fator nuclear κB
NF-κβ	-	Fator nuclear de transcrição kappa beta
nmol/mg	-	Nano mol por miligrama
NO	-	Óxido nítrico
°C	-	Graus centígrados
PAF	-	Fator agregador de plaquetas
PAF	-	Fator ativador de plaquetas
PCK	-	Proteína kinase C
PCR	-	Proteína C reativa
PDGF	-	Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	-	Potencial hidrogeniônico
PMN	-	Polimorfonuclear
PTK	-	Proteína tirosina-quinase K
RNA _m	-	Ácido ribonucléico mensageiro
RNA _m	-	Ácido ribonucléico mensageiro
SDMO	-	Síndrome da disfunção de múltiplos órgãos

SF	-	Solução fisiológica
SIRS	-	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SIRS	-	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TAP	-	Tempo de ativação da protrombina
TGF	-	Fator de crescimento transformador
TGO	-	Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP	-	Transaminase glutâmico-pirúvica
TLR4	-	Receptor <i>Toll Like</i> 4
TNF α	-	Fator de necrose tumoral alfa
TRAF-6	-	Fator de necrose tumoral associado ao fator 6
UE/ml	-	Unidade endotóxicas por mililitro
pg/ml	-	Picograma por mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS	3
2 REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1 ENDOTOXEMIA E REAÇÃO INFLAMATÓRIA SISTÊMICA	4
2.1.1 A Endotoxina	4
2.1.2 Citocinas inflamatórias e reação inflamatória sistêmica	8
2.2 A SEPSE	11
2.3 MODELOS ANIMAIS DE SEPSE	15
2.4 CICATRIZAÇÃO DAS ANASTOMOSES INTESTINAIS	17
3 MÉTODO	24
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	24
3.2 AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO	25
3.3 INDUÇÃO DE ENDOTOXEMIA	25
3.3.1 Preparação do inóculo de lipopolissacarídeo (LPS)	25
3.4. PROCEDIMENTO CIRÚRGICO	26
3.4.1 Pré-operatório	26
3.4.2 Per-operatório	26
3.4.3 Pós-operatório	27
3.5. COLETA DE AMOSTRAS	28
3.5.1 Coleta de sangue	28
3.5.2 Coleta de segmento intestinal	28
3.6. AVALIAÇÕES	28
3.6.1 Avaliação Ponderal	28
3.6.2 Avaliação da Endotoxemia	29
3.6.2.1 Avaliações hematológicas	29
3.6.2.1.1 Contagem de leucócitos e plaquetas	29
3.6.2.1.2 Contagem de bastonetes	29
3.6.2.2 Avaliações da função hepática	29
3.6.2.2.1 Dosagem de bilirrubinas	29
3.6.2.2.2 Dosagem de transaminases	29
3.6.2.2.3 Avaliação do tempo de ação da protrombina (TAP)	29
3.6.2.3 Avaliações da função renal	30
3.6.2.3.1 Dosagem de Uréia	30
3.6.2.3.2 Dosagem de Creatinina	30

3.6.2.4. Dosagem dos níveis séricos de Endotoxina	30
3.6.2.5 Dosagem imunoenzimática dos níveis séricos do Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF α)	30
3.6.3 AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO INTESTINAL	31
3.6.3.1 Dosagem de Hidroxiprolina Tecidual	31
3.6.3.2 Avaliação histométrica da porcentagem de colágeno intestinal maduro e imaturo	31
3.6.3.3 Avaliação imunocitoquímica do antígeno nuclear de proliferação celular	32
3.6.3.4 Avaliação histopatológica pela Hematoxilina e Eosina	33
3.7 AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS	34
4 RESULTADOS	35
4.1 AVALIAÇÃO PONDERAL	35
4.2 AVALIAÇÃO DA ENDOTOXEMIA	35
4.2.1 Avaliações hematológicas	39
4.2.2 Avaliações da função hepática	41
4.2.3 Avaliações da função renal	45
4.2.4 Avaliação dos níveis séricos de endotoxina	47
4.2.5 Avaliação dos níveis séricos de TNF α	48
4.3 AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO INTESTINAL	49
4.3.1 Dosagem de hidroxiprolina tecidual	49
4.3.2 Avaliação histométrica da porcentagem de colágenos intestinais maduro e imaturo	50
4.3.3. Avaliação imunocitoquímica do antígeno nuclear de proliferação celular	52
4.3.4. Avaliação histopatológica	53
5 DISCUSSÃO	56
5.1. O MODELO ANIMAL DE ENDOTOXEMIA	56
5.2. AVALIAÇÃO DO ESTADO ENDOTÓXICO	60
5.3. AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO INTESTINAL	62
6 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXO	78
ANEXO 1 - EM PESQUISA COM ANIMAIS PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA	78
APÊNDICES	79
APÊNDICE 1 - MATERIAL E METODOLOGIA PARA INDUÇÃO DE ENDOTOXEMIA	79
APÊNDICE 2 - METODOLOGIA PARA COLETA DE SANGUE POR PUNÇÃO CARDÍACA	80
APÊNDICE 3 - MATERIAIS E METODOLOGIA PARA DOSAGEM DE ENDOTOXINA	81

APÊNDICE 4 - MATERIAIS E METODOLOGIA PARA DOSAGEM DE TNF α	83
APÊNDICE 5 - MATERIAIS E METODOLOGIA PARA DOSAGEM DE HIDROXIPROLINA	85
APÊNDICE 6 - MATERIAIS E METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DA MATURAÇÃO DE COLÁGENO INTESTINAL PELO MÉTODO SIRIUS RED F3BA	88
APÊNDICE 7 - MATERIAIS E METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA)	90
APÊNDICE 8 - GRUPOS EXPERIMENTAIS - PESAGENS DIÁRIAS (gramas)	91
APÊNDICE 9 - GRUPO CONTROLE - PESAGENS DIÁRIAS (gramas)	92
APÊNDICE 10 - T0 - PESAGENS (gramas)	92
APÊNDICE 11 - T7 - PESAGENS (gramas)	93
APÊNDICE 12 - T14 - PESAGENS (gramas)	93
APÊNDICE 13 - CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	94
APÊNDICE 14 - CONTAGEM TOTAL DE PLAQUETAS ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	94
APÊNDICE 15 - PORCENTAGEM DE BASTONETES (%)	95
APÊNDICE 16 - BILIRRUBINA TOTAL (mg/dl)	95
APÊNDICE 17 - TGO (U/L)	96
APÊNDICE 18 - TGP (U/L)	96
APÊNDICE 19 - TEMPO DE AÇÃO DA PROTROMBINA (TAP - segundos)	97
APÊNDICE 20 - URÉIA (mg/dl)	97
APÊNDICE 21 - CREATININA (mg/dl)	98
APÊNDICE 22 - ENDOTOXINA (UE/ml)	98
APÊNDICE 23 - DOSAGENS DE FATOR DE NECROSE TUMORAL α (picogramas/ml)	98
APÊNDICE 24 - DOSAGENS DE HIDROXIPROLINA TECIDUAL (microgramas de hidroxiprolina/miligrama de proteína)	99
APÊNDICE 25 - HISTOMETRIA COMPUTADORIZADA PARA COLÁGENOS MADURO E IMATURO (%)	100
APÊNDICE 26 - PORCENTAGEM DE POSITIVIDADE DO ANTÍGENO DE PROLIFERAÇÃO NUCLEAR	101
APÊNDICE 27 - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS PESAGENS EM T0	102
APÊNDICE 28 - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS PESAGENS EM T7	103
APÊNDICE 29 - AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS PESAGENS EM T14	104

1 INTRODUÇÃO

As operações gastrintestinais figuram entre os procedimentos cirúrgicos realizados com maior frequência. Passaram por excepcional desenvolvimento nos últimos dois séculos e de atitudes heróicas e experimentais tornaram-se procedimentos tecnicamente refinados. No transcurso deste processo evolutivo foi dada atenção diferenciada aos materiais de síntese, principalmente no que se refere às anastomoses intestinais (GIAQUINTO e MOTA, 2005). Há situações em que a intervenção cirúrgica intestinal, mesmo sob condições sépticas é a única decisão a ser tomada pelo cirurgião na busca de uma solução para o paciente. Nessas situações os agentes antimicrobianos e as medidas de suporte vital são amplamente utilizados, ainda que não sejam suficientes para diminuir a morbidade e mortalidade, que se mantêm crescentes a cada dia (MARQUES, 2005). São descritos fatores associados como o fornecimento inadequado de oxigênio, a tensão mecânica elevada, as deficiências nutricionais, os distúrbios metabólicos, os agentes farmacológicos e os processos inflamatórios e infecciosos, entre outros, como causas isoladas ou associadas ao insucesso do ato cirúrgico (WITTE e BARBUL, 1997).

Entre as complicações cirúrgicas gastrointestinais, as mais frequentemente descritas são a ulceração péptica, a isquemia intestinal e a falha na cicatrização anastomótica representada por 3,4% a 12% de deiscências (COSTA e JENKINS, 2009; WAGNER e EGGER, 2003).

A sepse afeta adversamente a cicatrização de anastomoses colônicas de forma desconhecida, desafiando o cirurgião a se voltar para as ciências básicas, buscando respostas fisiopatológicas (CONTER, ROOF e ROSLYN, 1988; TRUBIAN, 2008). A absoluta dificuldade de estudar o fenômeno da cicatrização intestinal em humanos sépticos, bem como por impedimentos éticos, impõem a necessidade do desenvolvimento de modelos animais, aceitando suas limitações, para melhor compreensão do processo evolutivo cicatricial nessas condições (BRASKEN, RENVALL e SANDBERG, 1989).

O termo “sepse”, refere-se à resposta inflamatória sistêmica secundária à infecção bacteriana grave. O Consenso Brasileiro de Sepse (2003) adverte que é prudente definí-la pelas suas características evolutivas e sugere a utilização do termo “sepse” em lugar de “septicemia”, porque o último não descreve completamente essa condição, restringindo o processo patológico à circulação sangüínea, quando na realidade, os tecidos afetados também participam ativamente na gênese e propagação das próprias lesões. Tem como principais agentes etiológicos as bactérias Gram-negativas e as Gram-positivas e em menor escala os fungos. O termo “endotoxemia” descreve a liberação de endotoxina bacteriana na corrente circulatória e é diretamente associado à iniciação e manutenção da sepse (LEE *et al.*, 2002; ZANON *et al.*, 2008).

A epidemiologia da sepse demonstra os proibitivos índices de morbidade e mortalidade e as desalentadoras tentativas terapêuticas para a sua reversão. 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, são poucas as publicações que possam refletir sua real incidência na população. Silva *et al.*, (2004) demonstraram a incidência de 57 por 1000 pacientes/dia e Sales Júnior *et al.*, (2006) evidenciaram o elevado impacto econômico e social acarretado pela mortalidade causada pela sepse no Brasil, por ser uma das mais elevadas no mundo, com pacientes mais graves e com tempo de internação maior que em outros países.

Zanon *et al.*, em 2008, avaliaram 971 pacientes admitidos em UTI, dos quais 560 desenvolveram SIRS (58%). A causa mais freqüente de internação foi doença neurológica (28,9%), o mais freqüente local de infecção foi o trato respiratório (71,6%), e os germes mais prevalentes foram os bacilos Gram-negativos (53,2%). O tempo médio de permanência foi 6 (3-11) dias e a taxa de mortalidade foi 31,1%: 6,1% para SIRS (Síndrome da resposta inflamatória sistêmica) não infecciosa, 10,1% para sepse, 22,6% para sepse grave e 64,8% para choque séptico.

A fisiopatologia da sepse envolve a associação de intrincadas reações desencadeadas principalmente por bactérias Gram-negativas, que são comumente isoladas de indivíduos sépticos (AKAMINE *et al.*, 2006). Essas bactérias possuem um fator de virulência constituinte do próprio revestimento celular que as diferenciam das demais bactérias, a endotoxina ou LPS (lipopolissacarídeo). Este componente celular bacteriano ativa diretamente os macrófagos promovendo a liberação de simultânea de vários mediadores inflamatórios, ativação de células inflamatórias e ativação do sistema complemento pela via alternativa. Entre os mediadores liberados destacam-se o fator de necrose tumoral alfa ($TNF\alpha$), as interleucinas 1β (IL- 1β), 6 (IL-6) e a 10 (IL-10). Essas citocinas uma vez liberadas, perpetuam um ciclo inflamatório de abrangência sistêmica e induzindo estado hipercatabólico, sendo que a IL-10 tem sido apontada como contra-regulatória (ABBAS e LICHTMAN, 2004). Destaca-se desta maneira a endotoxemia como o fenômeno predecessor da sepse.

As manifestações clínicas da sepse dependem da intensidade da resposta inflamatória sistêmica e da presença e da gravidade de disfunções orgânicas. Além da disfunção gastrointestinal, cada vez mais descrita, outros seis grandes órgãos/sistemas podem ser acometidos durante sua evolução, alterações do sistema nervoso central, lesão pulmonar aguda, insuficiência renal, cardiovascular, hepática, coagulopatia e trombofilia adquirida (SILVA *et al.*, 2006).

Conforme observado por Minicucci *et al.*, em 2006, o resultado da interação dessas disfunções é a instalação de um estado de difícil controle e evolução imprevisível, também caracterizado pela desnutrição energético-protéica, causada tanto pelo aporte nutricional inadequado, como pela resposta metabólica ao estresse, que em conjunto, induzem estados de hipermetabolismo, hipercatabolismo, síndrome da deficiência de múltiplos órgãos (SDMO) e óbito. Um conjunto grande de evidências mostra que o progresso da instalação da SDMO tem por base a seguinte seqüência: lesão endotelial, ativação de mononucleares com liberação de citocinas seguindo-se de destruição ou disfunção tecidual mediada principalmente pelo $\text{TNF}\alpha$, fator ativador plaquetário, metabólitos do ácido araquidônico e radicais tóxicos de oxigênio. A endotoxemia, seguida de liberação de $\text{TNF}\alpha$ e indução de sepse é a principal causa de SDMO (AKAMINE *et al.*, 2006).

Apesar da existência de vários estudos experimentais sobre a reação inflamatória sistêmica induzida pela endotoxemia seguida de sepse, a grande maioria investiga em modelos experimentais de curta duração, provavelmente pelas dificuldades e riscos em manter animais nesse estado por longos períodos e escassas são as investigações sobre as alterações produzidas pelo estado endotóxico na cicatrização do sistema gastrointestinal (BOONTHAM *ET AL.*, 2003).

1.1 OBJETIVOS

Considerando a ocorrência de falhas nas anastomoses intestinais em pacientes sob estímulo inflamatório endotóxico, o presente estudo tem por objetivos:

Avaliar os efeitos da endotoxemia induzida nas fases pré, pós e pré/pós-cirúrgicas, ao sétimo dia de evolução da cicatrização colônica, tendo como indicadores o estado endotóxico avaliado por variação ponderal, níveis séricos de endotoxina e $\text{TNF}\alpha$, alterações hematológicas, funções hepática e renal e a evolução da cicatrização avaliada pelas dosagens de hidroxiprolina tecidual, viabilidade celular, quantificação de colágenos maduro e imaturo e avaliação histopatológica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ENDOTOXEMIA E REAÇÃO INFLAMATÓRIA SISTÊMICA

2.1.1 A Endotoxina

Os componentes da parede bacteriana são os principais desencadeadores da resposta inflamatória do hospedeiro. Entre esses destacam-se, os ácidos teicóico e lipoteicóico das bactérias Gram-positivas e o lipopolissacarídeo (LPS) ou endotoxina das bactérias Gram-negativas (GLAUSER, 2000).

Há vários anos, a endotoxina tem atraído a atenção dos pesquisadores devido aos seus efeitos deletérios observados em diferentes situações clínicas, desde um choque pirogênico até quadros de sepse grave. Historicamente, alguns fatos merecem citação como o conceito de endotoxina criado por Richard Pfeiffer em 1892, quando definiu a sua localização endógena na estrutura celular bacteriana, posteriormente, Alexandre Besredka em 1906 obteve anticorpos anti-endotoxina em coelhos e definiu sua capacidade pirogênica. Em 1933 André Boivin e Lydia Mesrobianu decreveram a estrutura bioquímica da endotoxina como um “antígeno glucido-lipídico de bactérias Gram-negativas”, de onde advém o termo lipopolissacarídeo (LPS), o qual passou a ser utilizado como sinônimo de endotoxina (KERATI e RUDNAI, 1972; FREUNDENBERG e GALANOS, 1990; REIETSCHEL e CAVAILLON, 2002). Atualmente muito se conhece desta molécula, porém, ainda não se dispõe de meios para o controle de seus efeitos e busca-se através da modulação da sua interação com receptores celulares, o controle da ativação da resposta inflamatória sistêmica (REIETSCHEL e CAVAILLON, 2002).

O LPS é uma molécula constituída por três domínios (figura 1), o lipídio A que é uma “âncora” hidrofóbica do lipopolissacarídeo seguido de uma sequência central de polissacarídeos central e um polissacarídeo distal, o antígeno “O”. Existem aproximadamente 10^6 resíduos de lipídio A numa única célula de *Escherichia coli* e são detectadas em concentrações picomolares pelo receptor do sistema imunológico inato, presente nos macrófagos e nas células endoteliais (RAETZ e WHITFIELD, 2002).

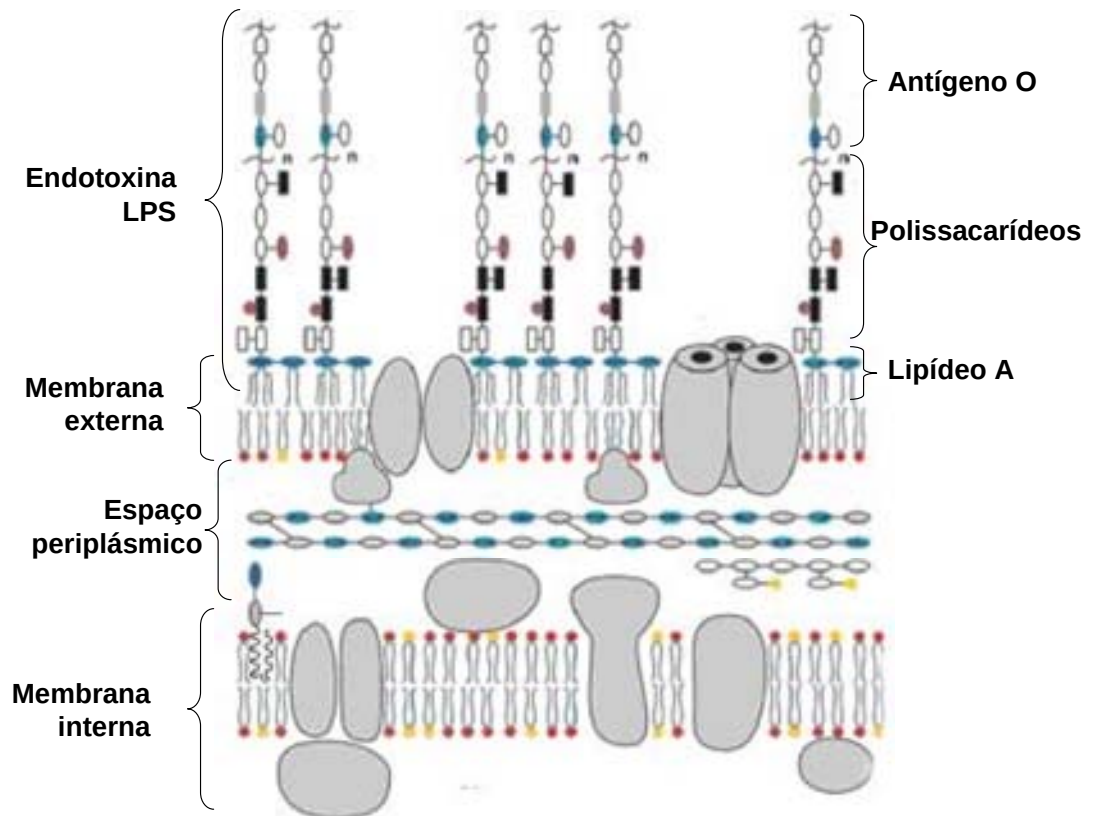


FIGURA 1 - DIAGRAMA DA ULTRAESTRUTURA DO REVESTIMENTO DA *Escherichia coli* DESTACANDO O LPS E SEUS DOMÍNIOS. FONTE: RAETZ e WHITFIELD, 2002

Esta molécula é liberada da membrana externa das bactérias durante a bipartição celular bacteriana, também na apoptose ou como resultado do tratamento com antibióticos contra a infecção bacteriana. Após sua liberação, o LPS é reconhecido pelos macrófagos e passa a ativá-los. Como resultado, ocorre aumento na atividade fagocítica e indução da secreção de citocinas pró-inflamatórias. Embora essas citocinas possuam um papel fundamental na resposta inflamatória local, sua produção excessiva está relacionada com a resposta inflamatória sistêmica e suas repercussões (ROSENFELD, PAPO e SHAI, 2006).

O mecanismo de ativação dos macrófagos pelo LPS se inicia pela ligação do LPS através do seu domínio tóxico, o lipídio A, a uma proteína específica no plasma, denominada LBP (*LPS-binding protein*), acelerando a ligação do LPS ao receptor CD14, um receptor primário de LPS, que é expresso nos macrófagos. O complexo LPS-CD14 inicia a sinalização intracelular para interagir com o receptor de membrana, TLR-4 (*Toll-like receptor-4*), resultando na ativação dos macrófagos, conforme representado na figura 2.

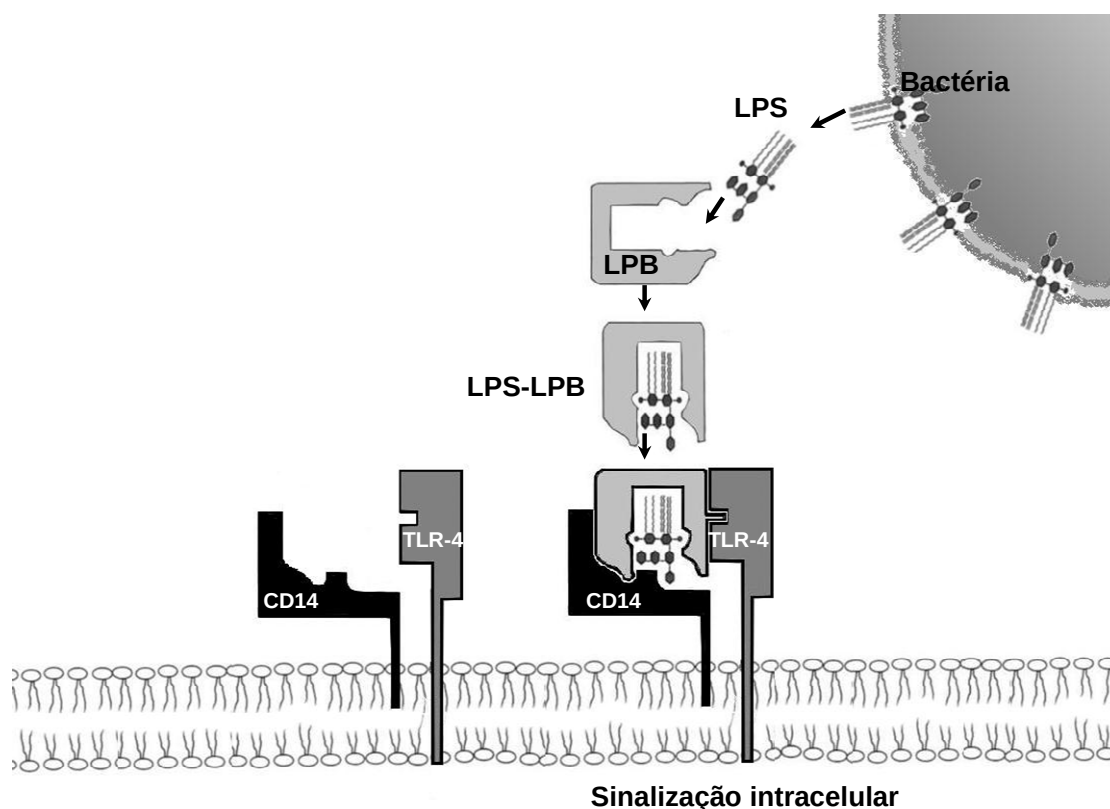


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS EVENTOS ENVOLVIDOS APÓS O ESTÍMULO PELA ENDOTOXINA. "O LPS DA SUPERFÍCIE DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS É LIBERADO E LIGA-SE AO RECEPTOR ESPECÍFICO LBP FORMANDO UM COMPLEXO. ESSE COMPLEXO LIGA-SE AOS RECEPTORES DE SUPERFÍCIE CD14 E TLR-4 DOS MACRÓFAGOS RESULTANDO NA ATIVAÇÃO CELULAR ATRAVÉS DE SINALIZAÇÕES MOLECULARES INTRACITOPLASMÁTICAS.
FONTE: GLAUSER, 2000

Até os anos 80, os receptores para LPS não eram ainda conhecidos e nessa década importantes descobertas foram evidenciadas através de modelos animais. Coutinho em 1976 demonstrou que linfócitos B de camundongos C57BL10/ScCr não eram ativados pelo LPS. Jansen *et al.*, em 1991, descreveram um panorama geral do mecanismo indireto pelo qual atuam os produtos bacterianos utilizando uma linhagem mutante de camundongo conhecida como C3H/HeJ, os quais não demonstraram nenhuma reatividade ao LPS. Realizaram nesses animais transplante de medula óssea, utilizando como doadores camundongos normais compatíveis e tornaram aqueles animais mutantes suscetíveis aos efeitos letais do LPS. Evidenciaram também que a utilização de doadores C3H/HeJ na reconstituição da medula de camundongos normais produzia animais quiméricos que não respondiam ao LPS. Com esses resultados os autores aventaram a hipótese de que o mecanismo de ação da endotoxina é indireto sendo mediado por células hematopoiéticas.

Em 1995, Lefering e Neugebauer mostraram que a endotoxina é por si só pouco tóxica, necessitando de mediadores endógenos para produzir a totalidade dos eventos observados durante o choque séptico.

Em 1998, Poltorak *et al.*^a, verificaram que os macrófagos de camundongos C3H/HeJ também não eram ativados pelo LPS e estabeleceram que essa hiporresponsividade ocorria devido à deficiência de um gene denominado LPS, que se localizava no cromossomo 4. Em 1997, Medzhitov, Preston-Hurlburt e Janeway., transfectaram um gene humano o TLR-4, homólogo ao gene Toll da *Drosophila*, e verificaram a ativação da transcrição do fator nuclear κ B (NF- κ B) com conseqüente liberação de citocinas inflamatórias, com destaque para o TNF α . Nesse mesmo ano, Rock *et al.*, definiram que o receptor do tipo TLR-4 pertencia a uma família de receptores do tipo Toll (TRLs) também encontrados nas drosófilas.

O LPS para ativar a liberação de citocinas inflamatórias interage com um complexo formado por três proteínas de membrana CD14, TRL4 e MD2. Uma vez ativado o complexo, inicia-se a sinalização intracelular pelo 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 outra proteína adaptativa denominada TRAF6 (fator de necrose tumoral associado ao fator 6 (POLTORAK *et al.*, 1998^b). Esta associação induz a mobilização de cálcio, ativação da proteína tirosina quinase K (PTK) que leva à ativação de MAPquinasas, onde direta ou indiretamente irá ativar IKK1 e IKK2 (I kappa B Kinase 1 e 2), levando à ativação de NF κ B (fator nuclear kappa B) e da proteína citoplasmática ligada a um inibidor (I κ B). O NF- κ B quando não estimulado, encontra-se no citoplasma ligado a uma proteína inibitória a I κ B. Esse complexo impede a translocação do NF κ B para o núcleo (AKIRA e TAKEDA, 2004).

A ativação da via das proteínas-quinases C (PCK) leva à fosforilação do inibidor (I κ B) e à dissociação do complexo, permitindo que o NF κ B migre para o núcleo e realize sua função (BEUTLER *et al.*, 1986; MEDZHITOV, PRESTON-HURLBURT e JANEWAY, 1997). O NF κ 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 α , IL1 β , IL2 e IL6 (ROCK *et al.*, 1998; O'NEILL e BOWIE, 2007).

Desta forma, conforme demonstrado na figura 3, a ativação dos macrófagos pela endotoxina conduz à biossíntese de diversas citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina 1-beta (IL-1 β) e a interleucina 6 (IL-6) e coestimula a produção de algumas moléculas necessárias para a resposta imune adaptativa (RAETZ e WHITFIELD, 2002).

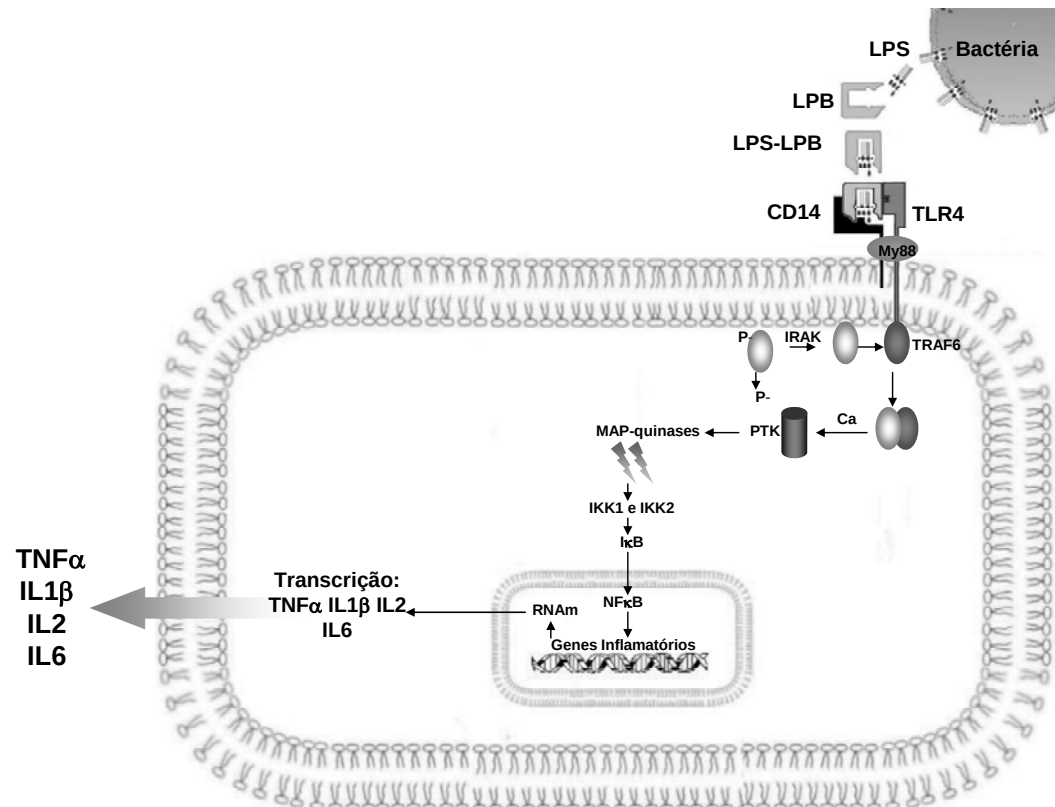


FIGURA 3 - DIAGRAMA REPRESENTATIVO DA ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS PELO LPS E TRANSCRIÇÃO DO FATOR NFκB COM CONSEQUENTE LIBERAÇÃO DE TNFα, IL1β, IL2 E IL-6.
FONTE: O AUTOR.

2.1.2 Citocinas inflamatórias e reação inflamatória sistêmica

As citocinas são polipeptídeos produzidos por diversos tipos celulares, que exercem funções regulatórias, através de ações autócrinas e parácrinas, atuando na ordem de pico ou nanomoles, com capacidade de modificar a função de diferentes tipos celulares. São liberadas por indução durante a fase efetora da resposta imunológica natural e específica, podendo controlar a proliferação e diferenciação, a apoptose e ativar ou inibir funções efetadoras em células maduras (DECKER *et al.*, 1989; ABBAS e LICHTMAN, 2004). O mais potente estímulo para liberação dessas citocinas na corrente sangüínea é a endotoxina e não simplesmente a presença de infecção no paciente (WAAGE *et al.*, 1989; BEUTLER *et al.*, 1986).

A liberação de citocinas é uma resposta rápida e auto-limitada. Essas moléculas não são armazenadas como pré-formadas e sua síntese é iniciada por um gene de transcrição com ativação transcricional transitória com moléculas de RNAm instáveis. A associação entre período curto de ativação transcricional e meia vida biológica curta do RNAm fazem com que a secreção de citocinas seja transitória e dependente da interação ligante-receptor (WALKER *et al.*, 1985; ABBAS e LICHTMAN, 2004).

As manifestações clínicas da sepse resultam da ação da endotoxina bacteriana sobre o hospedeiro, conduzindo-o a uma resposta imunológica inflamatória estereotipada com desequilíbrio da homeostase, bloqueio metabólico em vários órgãos e a resultante final é a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO) e óbito na maioria dos casos (PARILLO, 1993; HILL e HILL., 1998; PEREIRA JR *et al.*, 1998).

Durante a resposta inflamatória estimulada por endotoxina, TNF- α , IL-1 β e a IL-6 são as citocinas liberadas que atuam como mediadores do metabolismo intermediário (figura 3), alterando as concentrações de insulina, glucagon, corticosterona circulante e a síntese hepática das proteínas de fase aguda (FUJIHARA *et al.*; 2003). Essas citocinas são responsáveis pela reativação das células fagocitárias e dependendo da dose, podem desencadear vários efeitos no hospedeiro como a ativação da cascata inflamatória, formando um ciclo vicioso inflamatório (BLACKWELL e CHRISTMAN, 1996).

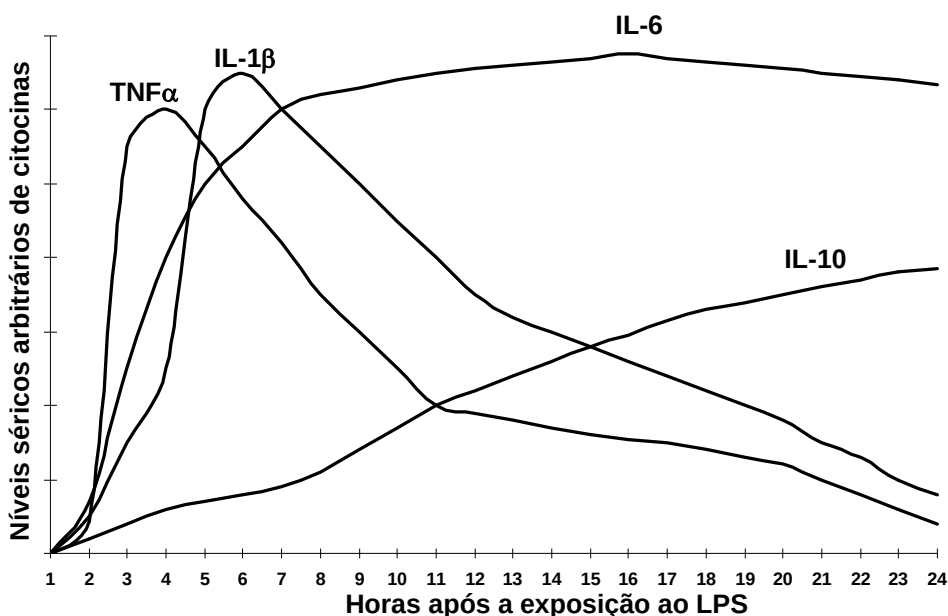


FIGURA 4 - GRÁFICO ESQUEMÁTICO DA CINÉTICA DA LIBERAÇÃO DE CITOCINAS EM VIGÊNCIA DE SEPSE.
FONTE: BLACKWELL e CHRISTMAN, 1996

O TNF- α é produzido em sua maior quantidade por macrófagos, contudo outras células estão associadas à sua produção, como monócitos, células de Kupffer, mastócitos e linfócitos (BEUTLER e CERAMI, 1988). A resposta biológica máxima do TNF- α ocorre com ocupação de pequeno número de receptores, em torno de 5 a 10% (TSUJIMOTO e VILCEK, 1986). A sua meia-vida plasmática é curta, de 14 a 18 minutos no ser humano, sofrendo metabolização hepática, no trato gastrointestinal e também nos rins.

Sua presença é também detectada no plasma de pacientes com câncer, em agressões térmicas, em casos de rejeição de transplante renal e insuficiência hepática fulminante (FONG *et al.*; 1990). É um pirogênio endógeno, que age no eixo hipotálamo-

hipofisário e possui ações imunoestimulatórias importantes no combate de infecções, provocando a liberação de neutrófilos, produção de superóxidos, lisozimas e ativação de macrófagos. O $\text{TNF-}\alpha$ está relacionado a alterações metabólicas, como aumento no transporte transmembrana de glicose, glicogenólise, estimulação de degradação protéica nos músculos esqueléticos e elevação de triglicérides e ácidos graxos livres plasmáticos, resultando em hiperlipidemia com exagerada perda de gordura corporal, observada em infecções e outros processos catabólicos, além do que, sua produção crônica em baixas concentrações, propicia a remodelação tecidual (DINARELLO *et al.*, 1986).

A resposta pirogênica é o efeito mais conhecido, mas apenas um dos vários efeitos produzidos por 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 (DINARELLO *et al.*, 1986). Também causa profunda anorexia e contribui para o desenvolvimento de caquexia, estimula a coagulação na superfície endotelial, aumenta a permeabilidade vascular, além de agir como fator de crescimento, estimulando a proliferação de microvasos e fibroblastos, dessa forma interferindo na cicatrização (SOUBA, 1994).

Entretanto, existe contato permanente entre o organismo humano e o animal com a endotoxina, devido à presença de bactérias Gram-negativas no trato gastrointestinal e na pele, estas pequenas quantidades de endotoxinas podem aumentar a resistência às infecções e apresentar atividade anti-tumoral (NOLAN, 1981).

A administração de endotoxina de bactérias Gram-negativas a ratos resulta em hipotensão sistêmica, aumento do hematócrito, redução do número de leucócitos circulantes (polimorfonucleares), monócitos e plaquetas. Essas alterações podem ser parcialmente atribuídas à ativação do complemento e geração de anafilatoxinas pela endotoxina (SMEDEEGARD, CUI e HUGLI, 1989). Em seres humanos a endotoxina foi utilizada em experimentos regrados, destacando-se Shedlofsky *et al.*, (1994), que utilizaram baixas doses de LPS e concluíram que a inflamação induzida pelo LPS em humanos está associada a significativa diminuição do farmacometabolismo hepático mediado pelo citocromo P450. A depressão nessa atividade leva várias horas para instalar-se após o início da resposta inflamatória e a sua amplitude se correlaciona com a intensidade da resposta inflamatória, avaliada pelas elevações das citocinas IL-6 e $\text{TNF}\alpha$.

2.2 A SEPSE

Na antiga Grécia usava-se o termo *pepse* para designar o processo de fermentação do vinho ou digestão alimentar e indicava vida e boa saúde, em contraposição, empregava-se o termo *sepse* para descrever situações onde havia putrefação e estava associado com doença e morte (NATHENS e MARSHALL, 1996). Sepsis passou a designar uma condição clínica resultante de infecção bacteriana e da presença desses microrganismos na corrente sanguínea. Há 50 anos, pacientes com falência de múltiplos órgãos não podiam ser mantidos vivos. Aqueles com infecções graves morriam rapidamente, já que os antimicrobianos estavam apenas começando a ser usados (MAJNO, 1991).

Na realidade essas diferentes terminologias caracterizam condições que se tornaram cada vez mais freqüentes em serviços de emergência e unidades de terapia intensiva (UTI). Inúmeros quadros clínicos denominados de "Sepsis ou síndrome séptica" (BONE *et al.*, 1989), "Falência de múltiplos órgãos" (EISEMAN, BEART e NORTON, 1977), "Falência de múltiplos órgãos e sistemas" (FRY, PEARLSTEIN e FULTON, 1980) são responsáveis por aproximadamente 80% de todos os óbitos em UTI. Essas denominações descrevem, na realidade, grupos altamente heterogêneos de doenças, com diferentes causas e prognósticos.

Em virtude dos progressos da biologia celular e molecular foi demonstrado que a agressão bacteriana ou de seus subprodutos (endotoxinas, LPS), não são os únicos responsáveis pela deterioração clínica dos pacientes em choque e que a resposta do hospedeiro desempenha papel importante nos diferentes tipos de agressões, quer infecciosas ou não, como pancreatite ou trauma (DEITCH, 1992).

A identificação de mediadores e dos mecanismos envolvidos na produção das alterações fisiológicas, metabólicas e celulares (DARVILLE, GIROIR e JACOBS, 1993), o papel das células endoteliais, das moléculas de interação célula-endotélio, do endotélio do trato intestinal (WANG e ANDERSSON, 1995) são de grande interesse, porque estão envolvidos na perda da capacidade de homeostase do organismo.

Existem três fases arbitrárias da cascata inflamatória: iniciação, ampliação e agressão durante as quais se estudam os mediadores circulantes. Muitas substâncias são capazes de iniciar a cascata inflamatória. As endotoxinas foram responsabilizadas como iniciadoras da cascata inflamatória em muitos doentes, por isso foram extensamente estudadas em doentes em risco de sepsis e assinalados como marcadores diagnósticos. Dos vários estudos realizados não ficou claro se as endotoxinas seriam um bom marcador de uso clínico. Não existe ainda consenso sobre a pesquisa de um único marcador que diagnostique a sepsis, ficou como hipótese que as endotoxinas iniciam e ampliam a cascata inflamatória através de vários mecanismos incluindo o "priming" de neutrófilos para uma

resposta aumentada ao estímulo tal como fragmentos do complemento e ativação da cascata do complemento (CONSENSO BRASILEIRO DE SEPSE, 2003).

Muitos componentes da cascata incluindo C3, C3a, C5a e o complexo terminal C5b-9 foram medidos em doentes com sepse. Dos estudos realizados, ficou clara a evidência que a ativação do complemento ocorre em doentes com sepse, mas a medição simples da ativação do complemento não provou ser clinicamente útil como marcador diagnóstico e prognóstico da sepse (ABBAS e LICHTMAN, 2004).

As endotoxinas podem estimular a liberação de várias citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), interleucinas 1, 6 e 8, os quais foram implicados na patogênese da sepse sendo estudadas as suas potencialidades diagnósticas e prognósticas de cada um destes mediadores. Muitos destes demonstraram resultados entusiasmadores, especialmente os níveis circulantes de IL-6, contudo, a avaliação destes mediadores na corrente circulatória de pacientes sépticos não ainda de uso rotineiro (ABBAS e LICHTMAN, 2004).

A inoculação de $\text{TNF-}\alpha$ em voluntários demonstrou a eclosão de liberação de outras citocinas pró-inflamatórias que em conjunto induziram nestes pacientes um estado hipermetabólico incluindo febre, anorexia, hiperglicemia, hipoalbuminemia, alterações hematológicas como anemia, leucocitose, plaquetopenia, desvio nuclear à esquerda de neutrófilos e emagrecimento (WAAGE *et al.*, 1989). Estes autores inferiram então que estes efeitos sistêmicos tinham a função similar ao de um quadro inflamatório, ou seja, conter ou destruir os agentes infecciosos, remover o tecido lesado e reparar o tecido afetado. Contudo, a magnitude desta resposta inflamatória, desejável a princípio e deletéria na sua efetuação é que passou a ser chamada de choque séptico, caracterizado por hipotensão refratária, vasoconstrição periférica, taquipnéia. Iniciava-se a era dos estudos da relação entre a endotoxina e a liberação de $\text{TNF}\alpha$, na busca de terapias específicas que pudessem controlar a eclosão destes quadros desastrosos.

A administração de LPS na dose de 20 UE/kg, por dois dias consecutivos em voluntários humanos sadios e durante este período um coquetel de medicamentos foi ingerido, composto por antipirina, hexobarbital, teofilina e o clearance hepático de cada droga foi avaliado, bem como a liberação de $\text{TNF}\alpha$ e as IL-1 e IL-6, proteína C reativa e α -1-glicoproteína ácida. Demonstrou-se em humanos que a resposta inflamatória secundária à endotoxemia induzida por baixas doses de LPS, diminui a função metabólica do citocromo P450, além das 48 horas após a indução da endotoxemia e imputaram também a disfunção hepática em pacientes sépticos, os quais estão expostos à doses maiores de LPS e por tempo mais prolongado (SHEDLOFSKY *et al.*, 1994).

Em um quadro de sepse, devem ser avaliados e combatidos três processos distintos, porém interligados, que acontecem concomitantemente: o foco infeccioso, as alterações hemodinâmicas e a resposta inflamatória local ou generalizada. Até hoje, o tratamento de pacientes com sepse ou choque séptico é feito por meio de antibióticos e drogas que interferem nas alterações cardiovasculares não se intervindo na resposta inflamatória, podendo ser esse um dos motivos da alta mortalidade de pacientes com choque séptico (QUEZADO, BANKS e NATANSON, 1995).

Conforme descrito no Consenso Brasileiro de Sepse (2003), a causa mais comum de morte em pacientes com sepse é a disfunção de múltiplos órgãos (DMO), caracterizada pela deterioração aguda da função de dois ou mais órgãos. Os órgãos habitualmente envolvidos são pulmões, rins, coração, incluindo o sistema vascular, e o fígado. No fígado foi demonstrado *in vitro* que a imunoestimulação pelo LPS suprime o metabolismo endógeno e exógeno de substâncias pela redução da atividade do sistema oxidase do citocromo P450 hepático, por interferência do óxido nítrico liberado pela estimulação do LPS (KHATSENKO *et al.*, 1993).

Coagulopatia, a depender da definição, parece ser o denominador comum de todo o processo microvascular que embasa fisiopatologicamente a DMO. Outro órgão comumente envolvido é o sistema nervoso central, designado como encefalopatia séptica. No entanto, sua real prevalência é desconhecida, uma vez que pacientes sépticos se encontram, muitas vezes, sedados (AKAMINE *et al.*, 2006).

Publicado por Hotchkiss e Karl (1992), o metabolismo celular inadequado, em decorrência de defeitos na produção de energia, parece ser uma das principais causas de disfunção orgânica em pacientes sépticos. O perfeito funcionamento das vias metabólicas celulares depende precipuamente da disponibilidade de oxigênio. Contudo, a geração de ATP mitocondrial, depende de muitos outros fatores, tais como, da disponibilidade de quantidades catalíticas de NADH/NAD⁺, da integridade de vários sistemas enzimáticos que transportam elétrons e da manutenção de um gradiente protônico através da membrana mitocondrial. A importância da disponibilidade de oxigênio às células, na fisiopatologia da sepse foi demonstrada pela interrupção do metabolismo energético e por disfunção mitocondrial.

Sabe-se, no entanto, que em algumas fases evolutivas do choque séptico é inequívoca a participação da hipóxia tecidual. Vários mecanismos contribuem para a queda da tensão de oxigênio tecidual durante o processo séptico. Entre as mais conhecidas figuram a diminuição da pressão arterial (pressão de perfusão) e/ou do débito cardíaco, a redistribuição do fluxo sanguíneo tecidual, a formação de shunt periférico e a ocorrência de trombose difusa na microcirculação (MARIK e VARON, 1998).

As alterações metabólicas relacionadas com a perda de massa muscular e foram avaliadas por Michie (1996) e o autor definiu o estado de “Autocatabolismo séptico” para descrever a resposta metabólica que ocorre na sepse. Nessa condição, o mecanismo normal de conservação de proteínas e de energia atua como no jejum e não é verificado no início da sepse. A resposta metabólica implica na degradação acelerada das reservas corporais de proteínas, carboidratos e lipídeos. Destacam-se a hiperglicemia com resistência insulínica, o balanço intensamente negativo de nitrogênio e o desvio de proteínas do músculo esquelético para os tecidos esplâncnicos. Essas respostas são mediadas pelas citocinas inflamatórias como $TNF\alpha$ e as IL-1 e IL-6. A indução secundária de catecolaminas, cortisol e glucagon pelas citocinas representam outro mecanismo efetor importante. A sepse também envolve alterações da função cardiovascular, com alterações de fluxo para sítios metabólicos chaves, hipóxia e alterações na permeabilidade capilar.

O catabolismo muscular é um fenômeno característico da resposta metabólica na sepse, levando à depleção e consumo da massa muscular, afetando adversamente os resultados nos pacientes. Estudos em animais e em pacientes demonstraram que as proteínas miofibrilares, a actina e a miosina são particularmente sensíveis aos efeitos da sepse. Esses autores apontam entre os principais mediadores que induzem a avaria das proteínas musculares durante a sepse, o conjunto de ações desencadeadas pelas citocinas pro-inflamatórias como o $TNF\alpha$ e a IL-1, associadas aos glicocorticóides. O colapso da síntese de proteínas intracelulares é regulado por diversas vias proteolíticas, entre essas destaca-se a via energia-ubiquitina-dependente como a principal causadora da degradação de proteínas musculares. Uma consequência do catabolismo celular é a liberação de aminoácidos do tecido muscular, especialmente a glutamina. Essa situação é grave uma vez que não existe forma de armazenamento de proteínas estão pensados para serem funcionais (HASSELGREN e FISHER, 1998)

A hiperglicemia evidenciada na sepse é resultante de alterações no metabolismo de carboidratos, como a resistência periférica à insulina, aumentos da glicogenólise hepática e da gliconeogênese, que visam ao redirecionamento do fornecimento de energia a órgãos vitais. A resistência periférica à insulina está relacionada com a interferência da sinalização intra-celular causada pelo LPS com as diferentes moléculas adaptadoras da cascata inflamatória com produção de $TNF\alpha$ e as IL-1 e IL-6 e a cascata de ativação da via insulínica, especialmente pela ativação da serina-kinase envolvendo IKKB por uma via independente. Diversos mediadores neuroendócrinos e inflamatórios estão envolvidos neste processo, e a hiperglicemia é uma característica importante das alterações agudas que ocorrem durante essa resposta. Na fase aguda da resposta ao estresse, a estimulação neuroendócrina resulta em altos níveis circulatórios de glucagon, hormônio do crescimento, catecolaminas e glicocorticóides. Essas alterações hormonais, também conhecidas como

resposta contra-reguladora, e o aumento dos níveis circulatórios das citocinas inflamatórias, são importantes fatores que levam à hiperglicemia (CARLSON, 2003).

Uma característica marcante do estado séptico é a rápida perda da massa magra corporal. Apesar da síntese protéica, geralmente reduzida nesta situação, a proteólise continua a ocorrer simultaneamente e é observado o balanço nitrogenado negativo. A taxa de formação da uréia é aumentada, como são as taxas de síntese de creatinina, ácido úrico e amoníaco, todos são excretados em quantidades aumentadas na urina (SHAW e KOEA, 1993).

2.3 MODELOS ANIMAIS DE SEPSE

Considerando-se que a sepse tem início, na grande maioria dos casos, pela endotoxemia, e que a endotoxina é um componente da parede celular bacteriana, seria lícito imaginar que a inoculação de bactérias Gram-negativas em animais induziria um quadro de endotoxemia e posterior sepse. A realidade mostrou que diversas variáveis podem afetar o curso de um estudo experimental em sepse e a escolha do animal é a primeira a ser considerada. Posteriormente escolhe-se o agente bacteriano a ser utilizado ou a endotoxina, podendo-se optar por modelos cirúrgicos nos quais se liga e perfura-se o ceco para haver exudação fecal na cavidade abdominal. Cada escolha leva a um modelo, que conduzirá por sua vez a distintos resultados, não comparáveis entre si (FINK e HEARD, 1990).

A administração endovenosa de endotoxina é amplamente utilizada para o estudo da sepse, por mimetizar vários efeitos observados em pacientes com sepse e choque séptico, como por exemplo, as alterações hemodinâmicas e cardiovasculares, diminuição do débito urinário, redução da perfusão tissular, hiporresponsividade a agentes vasoconstritores, coagulação intravascular disseminada e a produção de grandes quantidades de citocinas na circulação. Além disso, é um modelo prático e reproduzível em muitas diferentes espécies animais, como ratos (MACARTHUR *et al.*, 2000), camundongos (ROVAL *et al.*, 1998), coelhos (BEM-SAHAUL *et al.*, 1999), cães (MITAKA *et al.*, 1997) e primatas (HINSHAW *et al.*, 1992), inclusive em humanos (van der POLL *et al.*, 1995) podendo-se utilizar também a via intraperitoneal e apresenta a vantagem da padronização das doses.

A administração intraperitoneal da bactérias vivas é um modelo, também muito utilizado para o estudo da sepse, pois também reproduz os sinais observados na doença humana, apresentando reprodutibilidade, como observado no modelo de endotoxemia. Além disso, a administração de bactérias na cavidade peritoneal se aproxima mais de um quadro de sepse observado na clínica, pois o processo se inicia a partir do foco infeccioso de disseminação na cavidade peritoneal, e não diretamente na circulação. Mas, ainda assim, o

início do processo ocorre de forma muito rápida, e não gradativa, como acontece na maioria dos casos clínicos e a mortalidade é elevada, sobrepondo um quadro infeccioso a um quadro inflamatório sistêmico (REMICK *et al.*, 2000, FADEL *et al.*, 2008).

O modelo de lesão intestinal com consecutiva liberação de flora microbiana por ligação e perfuração do ceco (*cecal ligation and puncture* - CLP) e introdução de cateter no cólon ascendente (*colon ascendens stent peritonitis* - CASP), com liberação da flora bacteriana foi descrito inicialmente por Wichtermann, BAUE e CHAUDRI em 1980. Esse modelo apresenta grande relevância para a compreensão da evolução da doença por ser decorrente de um trauma com perfuração das alças intestinais, colite ou peritonite pós-operatória. Nesse modelo, após a perfuração da parede intestinal, ocorre a liberação gradativa do conteúdo cólico para a cavidade peritoneal, induzindo peritonite, a qual pode evoluir para um quadro de sepse e choque séptico. Apresenta elevada mortalidade e critica-se a não padronização do estímulo séptico, uma vez que não se pode quantificar a liberação gradativa do conteúdo cólico para a cavidade peritoneal.

Apesar de esse modelo experimental estar próximo a um quadro clínico, e, por isso, ser um modelo mais interessante para o estudo da sepse, a maioria dos estudos em sepse experimental baseia-se em modelos nos quais a bactéria ou o LPS são administrados por via endovenosa ou intraperitoneal. Dados da literatura mostram que a patogênese da sepse, causada pela administração de LPS ou de bactérias por via endovenosa, difere daquela induzida por um foco infeccioso, como acontece em uma peritonite (BAGBY *et al.*, 1991).

Repka *et al.*, (2009) compararam as alterações induzidas em ratos na sepse induzida por inoculação endovenosa de lipopolissacarídeo (LPS) e por célula viável de *Escherichia coli* em diferentes esquemas de inoculação, quanto aos seguintes indicadores: acessibilidade metodológica, mortalidade e sobrevivência, nível de endotoxemia, liberação de fator de necrose tumoral alfa, alterações hematológicas e das funções hepática e renal. Este estudo teve duração de sete dias e utilizaram-se 50 ratos Wistar separados em 5 grupos com 10 ratos. Utilizou-se *Escherichia coli* sorotipo 0111:B4 e LPS obtido da mesma cepa bacteriana para os inóculos que foram padronizados com o mesmo conteúdo em unidades endotóxicas (36EU). Grupo controle (C) com animais normais. Grupo LPS, nos quais eram inoculados com endotoxina e separados em dois subgrupos conforme o calendário das inoculações: LPS-1 a cada 24 horas e LPS-2 a cada 48 horas. Grupo *Escherichia coli*, nos quais eram inoculados com suspensão bacteriana viável e também separado como o grupo anterior: EC-1 inoculação a cada 24 horas e EC-2 a cada 48 horas. Ao sétimo dia de evolução foram procedidas coletas de sangue nos animais sobreviventes para avaliações. Concluíram que administração de 36UE de endotoxina a cada 48 horas, pode ser utilizado com vantagens sobre os demais por ser mais acessível metodologicamente, por não induzir morte durante o período de sete dias e por induzir

endotoxemia, liberação de fator de necrose tumoral alfa, alterações hematológicas e das funções renal e hepática, alterações estas compatíveis com a sepse humana.

2.4 CICATRIZAÇÃO DAS ANASTOMOSES INTESTINAIS

A intervenção cirúrgica abdominal desenvolveu-se de maneira excepcional nos últimos dois séculos. Passou de atitudes heróicas e experimentais a procedimentos tecnicamente refinados, que exigem destreza e preparo técnico do cirurgião. Durante esta evolução, uma ênfase da investigação científica foi dada aos materiais de síntese, principalmente no que concerne às anastomoses intestinais e à compreensão do processo de cicatrização (MARQUES, 2005).

Na atualidade, as operações gastrointestinais figuram entre os procedimentos cirúrgicos mais freqüentemente realizados na maioria dos hospitais. Infelizmente, apesar de toda a técnica cirúrgica empregada, do maior entendimento do processo de cicatrização do tubo gastrointestinal, do conhecimento do efeito de fatores locais e sistêmicos sobre este processo e na vigência das melhores condições pré-operatórias nas cirurgias eletivas, as deiscências das anastomoses intestinais são descritas em 3,4% a 12% das anastomoses realizadas. As fístulas intestinais ocorrem em cerca de 3% a 5% dos casos. Estas complicações estão associadas a altas taxas de morbi-mortalidade (MAISH *et al.*, 1998.; WITTE e BARBUL, 1997). A falha na cicatrização anastomótica figura entre complicações freqüentes e fístulas em 3,5% a 37% das cirurgias abdominais eletivas, com mortalidade variando entre 6,25 a 48%. A sepse figura entre os fatores que influenciam desfavoravelmente o fechamento espontâneo de fístulas gastrointestinais, bem como favorece a mortalidade nessas situações (WAGNER e EGGER, 2003; CAMPOS *et al.*, 1996).

Nas últimas décadas, por meio do progresso tecnológico, da melhoria das condições de vida, de menores taxas de mortalidade infantil e do melhor controle das doenças crônicas, observa-se aumento da população geriátrica em níveis nunca antes verificados. Agrega-se ainda o aumento de pacientes críticos mantidos por longos períodos em unidades de terapia intensiva, graças à tecnologia atualmente disponível para esta finalidade, muitas vezes sob sedação, em estado hipercatabólico ou desnutridos. Contudo, as intervenções cirúrgicas nesses pacientes vêm demonstrando que especialmente em casos de sepse ou choque séptico o processo cicatricial é alterado, demandando tempo e nem sempre cumprindo os efeitos esperados (KINSELLA, 2005).

Toda ferida é uma solução de continuidade produzida em um tecido, pelos mais diversos agentes. Para corrigir essa lesão, o organismo lança mão de complicado mecanismo com a finalidade de restaurar a semelhança usual normal, denominado cicatrização e que envolve: quimiotaxia, divisão celular, neovascularização, síntese de

matriz protéica extracelular e remodelação da cicatriz (CAMPOS, BORGES-BRANCO e GROTH, 2007). CARREL, em 1910, pioneiramente classificou os eventos da cicatrização em três fases que são ainda aceitas até hoje, fase inflamatória, nos primeiros quatro dias, seguida pela fase proliferativa dos três aos 14 dias e finalizando com a fase de remodelação a partir do décimo dia, outros autores utilizam uma forma mais completa, separando a evolução cicatricial em quatro fases principais (figura 4), hemostasia, inflamação, proliferação e remodelação, sendo que essas fases se sobrepõem (GIAQUINTO e MOTA, 2005).

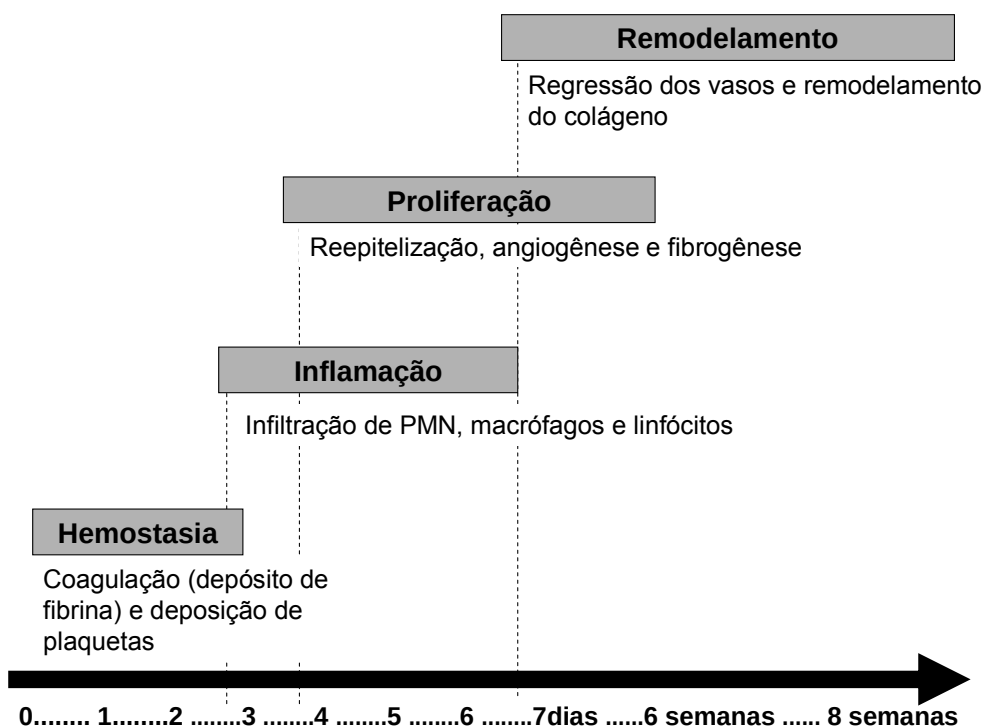


FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DAS FASES EVOLUTIVAS DA CICATRIZAÇÃO.
FONTE: ADAPTADO DE GIAQUINTO e MOTA, 2005

Independente do sistema classificatório do processo cicatricial é descrito que a fase inicial inflamatória inclui o processo de hemostasia, com aumento da permeabilidade vascular, ativação da quimiotaxia leucocitária para o local do reparo, liberação de citocinas e fatores de crescimento celular. A hemostasia é consequência da exposição do colágeno subendotelial às plaquetas, levando à ativação da via intrínseca do processo de coagulação. As plaquetas agregadas promovem a liberação de citocinas e de fatores de crescimento como: o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), o fator ativador plaquetário (PAF), a fibronectina e a serotonina. Nessa fase ocorre formação local de fibrina, a qual exerce sustentabilidade para neutrófilos, monócitos, fibroblastos e células endoteliais (GIAQUINTO e MOTA, 2005).

Os neutrófilos são as primeiras células migratórias a acessar o local de reparo, seguidos pelos macrófagos e linfócitos. Os macrófagos liberam citocinas, óxido nítrico, realizam fagocitose e ativam outros tipos celulares. Os linfócitos liberam linfocinas, como interferons e interleucinas. O acesso dessas células é facilitado pelo aumento da permeabilidade vascular, devido à inflamação e à liberação de prostaglandinas e pela ação quimiotática de uma série de mediadores locais, como o fator alfa de necrose tumoral (TNF- α), pelo TGF- β e pelas interleucinas 1 e 6 (WITTE e BARBUL, 1997). As principais células a sofrerem alterações fenotípicas, por meio da ação de citocinas derivadas dos macrófagos, são os fibroblastos e as células epidérmicas. Os fibroblastos ativados são responsáveis pela síntese do colágeno e pela contração da ferida.

A seguir inicia-se a fase proliferativa, com a infiltração de fibroblastos e a proliferação de células endoteliais responsáveis pelo processo de angiogênese, induzidas pelo PDGF e pelo fator de crescimento epidérmico (EGF). Ocorre também a reepitelização, pela proliferação das células endoteliais criando uma barreira contra infecções perda de líquidos pela ferida. A fase de maturação e remodelação caracteriza-se pela deposição de colágeno pelos fibroblastos e determina a resistência tênsil da cicatriz, sendo que a matriz extracelular altera-se pela deposição inicial de fibrina e de fibronectina provenientes da hemostasia e dos macrófagos, e a trombospondina 1. Seguem-se os glicosaminoglicanos, proteoglicanos e outras proteínas, como as proteínas ácidas segregadas ricas em cisteína (SPARC) e tardiamente pelo colágeno (GIAQUINTO e MOTA, 2005).

A molécula de colágeno é composta por três cadeias polipeptídicas em forma de uma tripla hélice contendo prolina, hidroxilisina e hidroxiprolina. A prolina e a hidroxiprolina estabilizam essas cadeias, sendo que 14% do colágeno composto por hidroxiprolina (KIVIRIKKO e RISTELLI, 1976).

O comportamento e a dinâmica do colágeno podem ser ilustrados de uma maneira prática no exemplo da cicatrização de uma anastomose. Durante os primeiros cinco dias após a realização de uma anastomose predomina o catabolismo do colágeno, nesta fase o material de síntese oferece sustentação e vedação ao canal alimentar. Após o sexto dia inicia-se uma fase de síntese de colágeno, e pode ser observado seu aumento progressivo até o 42º dia de pós-operatório. Concomitantemente, observa-se na cicatrização ganho progressivo de força tênsil até dois anos após a confecção da anastomose. Se aceita que não apenas a taxa absoluta do colágeno, mas também a forma de disposição de suas fibras, as quais são rearranjadas no transcurso do tempo, são responsáveis pela resistência tecidual. Nas cicatrizes recentes observa-se aumento percentual no colágeno do tipo III em relação ao colágeno do tipo I. Este é o tipo predominante nas fases mais tardias da cicatrização (DIETZ *et al.*, 2005).

Até o presente já foram identificados 14 tipos diferentes de colágeno em mamíferos. Destes, quatro, numerados de I a IV, são os mais conhecidos. Eles diferem entre si pela composição química, pelo modo de associação entre suas moléculas, pelas funções que desempenham e pelas doenças que a sua má-formação e a sua produção excessiva ou insuficiente podem causar. Em tecidos intactos, o colágeno tipo I predomina e constitui 80 a 90% e os restantes 10 a 20% são do tipo III. No trato gastrointestinal a camada submucosa contém a maior quantidade de colágeno em relação às outras camadas e difere da pele, sendo 68% do tipo I, 20% do tipo III e 12% do tipo V, encontrado em vasos sanguíneos (GIAQUINTO e MOTA, 2005).

Assim, o estudo da quantidade de colágeno, representado pela taxa de hidroxiprolina tecidual, permite uma análise valiosa, porém parcial, de uma cicatriz, pois é a única proteína do organismo animal que contém hidroxiprolina em quantidade significativa. STTETEN (1949), em estudo com ratos, demonstrou que a hidroxiprolina não deriva da ingestão alimentar, mas da hidrólise da prolina. Considerando-se que o decréscimo da concentração desse aminoácido no período pós-operatório evidencia o catabolismo do colágeno, a sua dosagem é utilizada como índice de evolução da cicatrização. A força de tensão apresenta correlação positiva com a concentração da hidroxiprolina (DIETZ *et al.*, 1995).

DIETZ *et al.*, (1995) propuseram um método bioquímico para a determinação de hidroxiprolina encontrada em amostras teciduais não cicatriciais do canal alimentar de cães, utilizando-se a técnica fotolorimétrica. Estabeleceram-se valores médios para os segmentos do esôfago cervical, esôfago torácico, estômago, duodeno, jejunoíleo, colo transversal, colo descendente e reto. Apresenta-se uma revisão da técnica empregada e discutem-se aspectos bioquímicos de interesse para este processamento no contexto da ótica do cirurgião na experimentação animal. Este método demonstrou consistência e foi empregado em diversos estudos de anastomoses intestinais em ratos e cães.

A dosagem de hidroxiprolina em amostras de intestino foram executadas para avaliação da cicatrização através de observação histológica e pela mensuração do conteúdo tecidual de hidroxiprolina, investigar, qualificar e quantificar as alterações morfológicas do cólon distal e proximal, após colostomia tipo Hartmann em ratos. Os valores não apresentaram diferenças significantes quando comparadas com o grupo controle e dessa maneira, não ficou evidenciada a diminuição da hidroxiprolina, e por conseguinte, a síntese do colágeno (SIMÕES *et al.*, 2000).

As anastomoses do trato gastrointestinal podem ter sua cicatrização avaliada por diferentes métodos. Em cirurgia experimental, os métodos mais comumente descritos são os parâmetros clínicos, mecânicos, imunoistopatológicos e bioquímicos. Outros parâmetros

que podem ser utilizados são os microbiológicos, radiográficos, microangiográficos e de microscopia eletrônica (VIZZOTTO JUNIOR *et al.*, 2003).

Diversos autores estudaram os efeitos de medicações e de condições clínicas sobre a cicatrização de anastomoses colônicas, através da quantificação da hidroxiprolina tecidual. Desnutrição e peritonite levam à maior incidência de deiscências, à diminuição da força de ruptura e da hidroxiprolina tecidual (LEITE *et al.*, 1993), o diclofenaco induziu maior taxa de mortalidade, maior reação inflamatória polimorfonuclear, retardo na regeneração da mucosa, diminuição dos macrófagos e do colágeno tecidual (MINOSSI *et al.*, 2001), anastomoses realizadas em cólon com doença inflamatória está mais propensa a complicações pelo atraso na maturação e na ordenação das fibras do colágeno (GRECA *et al.*, 2000), na vigência de peritonite, a concentração de colágeno foi menor no 3.º e no 7.º dia de pós-operatório e que no 7.º dia predominou o colágeno imaturo, tipo III, porém, essas alterações não interferiram na capacidade da anastomose suportar pressão (BIONDO-SIMÕES *et al.*, 2000), o efeito do quimioterápico cisplatina retarda a cicatrização das anastomoses colônicas (VIZZOTTO JR *et al.*, 2003).

Thá Nassif *et al.*, (2009) constataram o predomínio de colágeno imaturo, tipo III ($p < 0,0001$) e decréscimo do colágeno maduro, tipo I ($p < 0,0001$) em ratos com hipotireoidismo e que a hipofunção tireoidiana interfere no processo cicatricial do cólon.

Os parâmetros histológicos permitem avaliar a presença e a estrutura dos componentes celulares envolvidos no processo de cicatrização, porém são subjetivos e sujeitos a erros de interpretação. Desta forma, é importante utilizar métodos histomorfométricos quantitativos para que seja possível realizar comparações e avaliações do processo de cicatrização.

Junqueira, Cossermelli e Brentani em 1978 confirmaram em seus experimentos, que a coloração com picro-sírius (PCS) é um procedimento específico para o colágeno, uma vez que não cora fortemente as glicoproteínas. Estes mesmos autores sugeriram que há aumento de, pelo menos, 700% na intensidade da luz devido à birrefringência do colágeno corado pelo PCS, quando comparado com controles. Esta característica é responsável pelas imagens claras que permitem a observação acurada do colágeno em diferentes tecidos. Na observação com luz polarizada, as fibras com maior entrelaçamento e maior espessura apresentaram coloração laranja-avermelhada e foram denominadas colágeno do tipo I (maduro). As fibras mais afiladas e menos entrelaçadas apresentaram coloração esverdeada e foram denominadas colágeno tipo III (imaturo). O cálculo da porcentagem das fibras, classificadas em maduras ou imaturas de acordo com a sua coloração, permite avaliação qualitativa de fibras colágenas, podendo ser utilizado em estudos de cicatrização de anastomoses.

Outra forma histológica de avaliação da cicatrização é a quantificação do antígeno de proliferação celular (PCNA), como indicador de proliferação e viabilidade celular na cicatriz. A proliferação celular pode ser definida como o aumento do número de células resultante da complementação do ciclo celular. Este engloba uma cascata de eventos, processados de maneira ordenada, assegurando a duplicação fiel dos componentes celulares em uma sequência lógica e a divisão destes componentes em duas células filhas (LEVINE *et al.*, 1994).

A concentração do PCNA é variável durante as etapas do ciclo celular, sendo maior na fase G1 tardia, com pico na fase G1/S, estando praticamente ausente nas fases G2 e M e pode não ser específico da fase S ou, necessariamente, estar relacionado com o ciclo celular, podendo estar associado ao reparo do DNA ou ser expresso por influência de fatores de crescimento em células que não estejam no ciclo celular (KURKI *et al.*, 1986).

O PCNA é uma proteína nuclear de 36kd, co-fator da polimerase delta, com importante papel na replicação do DNA é considerado um agente intimamente associado à replicação celular, sua distribuição no ciclo celular aumenta a partir da fase G1, atingindo o pico máximo em S, diminuindo a partir da fase G2, e passando a exibir níveis tão baixos na fase M e em células quiescentes, que não é identificado por métodos imunohistoquímicos. (BRAVO, 1986; BRAVO e MACDONALD-BRAVO, 1987; MARTINEZ-LARA *et al.*, 1996).

Nóbrega *et al.*, em 2007 avaliar a angiogênese e a reepitelização de anastomoses colônicas em ratos jovens normoglicêmicos, velhos normoglicêmicos e hiperglicêmicos. Utilizaram as técnicas imunoistoquímicas para PCNA e antifator VIII e verificaram que a angiogênese foi maior no grupo jovem do que nos velhos normoglicêmicos e também que nos velhos hiperglicêmicos. No terceiro dia de evolução, os grupos velhos não foram diferentes, mas no sétimo e no 14.º dias, a angiogênese foi maior no grupo normoglicêmico. Concluíram que a idade é importante para a reepitelização e angiogênese das anastomoses colônicas e a hiperglicemia interfere principalmente na angiogênese.

Destaca-se na literatura consultada os achados de Thorton *et al.*, em 1997, que evidenciaram em estudo experimental em ratos, utilizando técnicas de biologia molecular, a desregulação simultânea da expressão gênica de síntese de colágeno e da diminuição da resistência anastomótica na cicatrização gastrointestinal, em condições de endotoxemia. Esses resultados apontam para um possível futuro da prática cirúrgica e da melhor elucidação de mecanismos fisiopatológicos, baseadas em práticas moleculares.

3 MÉTODO

3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Utilizaram-se 70 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, com idades entre 132 a 141 dias e pesos de $142,57 \pm 11,51$ gramas, provenientes do biotério da Universidade Federal do Paraná, mantidos durante o experimento nas dependências da Coordenação de Ensino e Pesquisa do Hospital e Maternidade Angelina Caron. Foram observadas as seguintes normatizações: Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA-2000). Nomenclatura Anatômica proposta por Walker e Homberger em 1997 e as Normas para Apresentação de Trabalhos da Universidade Federal do Paraná (2007).

Este projeto foi aprovado em 27 de julho de 2006 pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais do Hospital e Maternidade Angelina Caron, conforme parecer nº 11/06 CEPA/HAC (anexo 1). Os animais foram separados em grupos conforme descrito no quadro 1:

QUADRO 1 - DEMONSTRATIVO DA ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DO ESTUDO E PROCEDIMENTOS REALIZADOS:

Grupo	Sub-grupo	n	Procedimentos
Endotoxemia pré-cirúrgica (Pré)	SF	10	Inoculação a cada 24 horas de SF por sete dias. Colotomia no sétimo dia e inoculação de SF por sete dias a cada 24 horas até o 14º dia.
	LPS	10	Inoculação a cada 24 de LPS por sete dias. Colotomia no sétimo dia e inoculação de SF por sete dias a cada 24 horas até o 14º dia.
Endotoxemia pós-cirúrgica (Pós)	SF	10	Inoculação a cada 24 horas de SF por sete dias. Colotomia no sétimo dia e inoculação de SF por sete dias a cada 24 horas até o 14º dia.
	LPS	10	Inoculação a cada 24 horas de SF por sete dias. Colotomia no sétimo dia e inoculação de LPS por sete dias a cada 24 horas até o 14º dia.
Endotoxemia pré e pós-cirúrgica (Pré-pós)	SF	10	Inoculação a cada 24 horas de SF por sete dias. Colotomia no sétimo dia e inoculação de SF por sete dias a cada 24 horas até o 14º dia.
	LPS	10	Inoculação a cada 24 de LPS por sete dias. Colotomia no sétimo dia e inoculação de LPS por sete dias a cada 24 horas até o 14º dia.
Controle (C)		10	Animais normais, mantidos por sete dias, submetidos à laparotomia e laparorrafia no sétimo dia e mantidos até o 14º dia.

LEGENDA: SF-SORO FISIOLÓGICO / LPS-LIPOPOLISSACARÍDEO

3.2 AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

Após o recebimento, os animais foram separados em grupos de cinco e submetidos ao seguinte protocolo:

- Triagem através de exames parasitológicos de fezes e inspeção da pelagem para investigação de ectoparasitas, sendo descartados os animais portadores;
- Alojamento em caixas de prolipropileno desinfetadas com Hipoclorito de Sódio a 1% contendo sepilho esterilizado, substituídos a cada 48 horas;
- Alocados em sala específica para animais de laboratório, com temperatura controlada entre 19 a 23°C, sob ciclos de iluminação automaticamente regulados a cada 12 horas, com exaustão forçada;
- Receberam ração específica para a espécie (Nuvilab - Nuvital®) e água acidificada a pH 4,0 *ad libitum*;
- Mantidos em período de dez dias para adaptação.

3.3 INDUÇÃO DE ENDOTOXEMIA

3.3.1 Preparação do inóculo de lipopolissacarídeo (LPS)

Utilizou-se a dose de 1mg/kg de LPS conforme a metodologia proposta por MORRISON e LEIVE (1975) e FINK e HEARD (1990) sendo que a solução era preparada imediatamente antes da inoculação. As inoculações foram feitas pela veia dorsal peniana para acesso endovenoso, com os ratos sob sedação com halotano, conforme demonstrado na figura 2. A metodologia de preparação da solução de LPS e demais detalhes metodológicos estão disponíveis no apêndice 1.

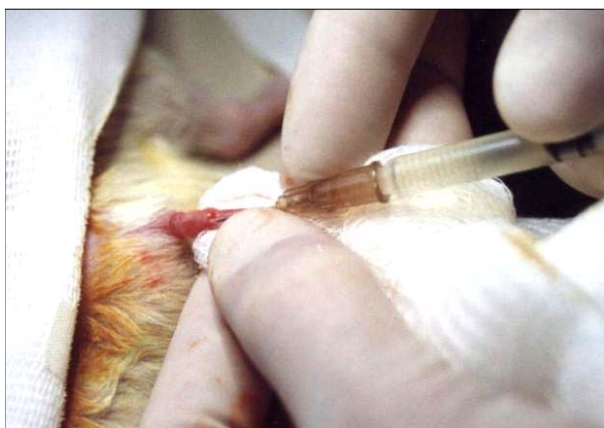


FIGURA 6 - ASPECTO ILUSTRATIVO DA INOCULAÇÃO DA SOLUÇÃO DE LPS POR VIA ENDOVENOSA, ATRAVÉS DA VEIA DORSAL PENIANA.

3.4 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

3.4.1 Pré-operatório

Todos os ratos foram submetidos a jejum de 12 horas, sendo oferecida água *ad libitum*.

3.4.2 Per-operatório

Os ratos foram pesados e submetidos à sedação por inalação de halotano (Tanohalo-Cristália®) em circuito fechado e recebiam anestesia por injeção intramuscular com cloridrato de cetamina (Ketamin-Cristalia®) na dose de 100mg/kg, associada a 10mg/kg de cloridrato de xilasina (Xilazin-Syntec®). Em seguida procedia-se à tricotomia ampla do abdômen e eram fixados em decúbito dorsal, degermados com álcool-iodado e colocavam-se campos cirúrgicos fenestrados esterilizados.

Por meio de incisão abdominal mediana de cerca de três centímetros de extensão acessou-se a cavidade peritoneal para a exposição do cólon. Procedeu-se uma colotomia por secção completa do cólon, a aproximadamente cinco centímetros distais da válvula íleo-cecal, atentando para a preservação dos vasos cólicos. A reconstrução da secção foi realizada por anastomose término-terminal em plano único total com oito pontos separados de fio monofilamentar de *nylon* 6.0 (Mononylon® 6.0, Ethicon). O fechamento da parede foi feito por sutura contínua com fio monofilamentar de *nylon* 3.0 (Mononylon® 3.0, Ethicon) em dois planos: músculo-aponeurótico e cutâneo (figura 7).

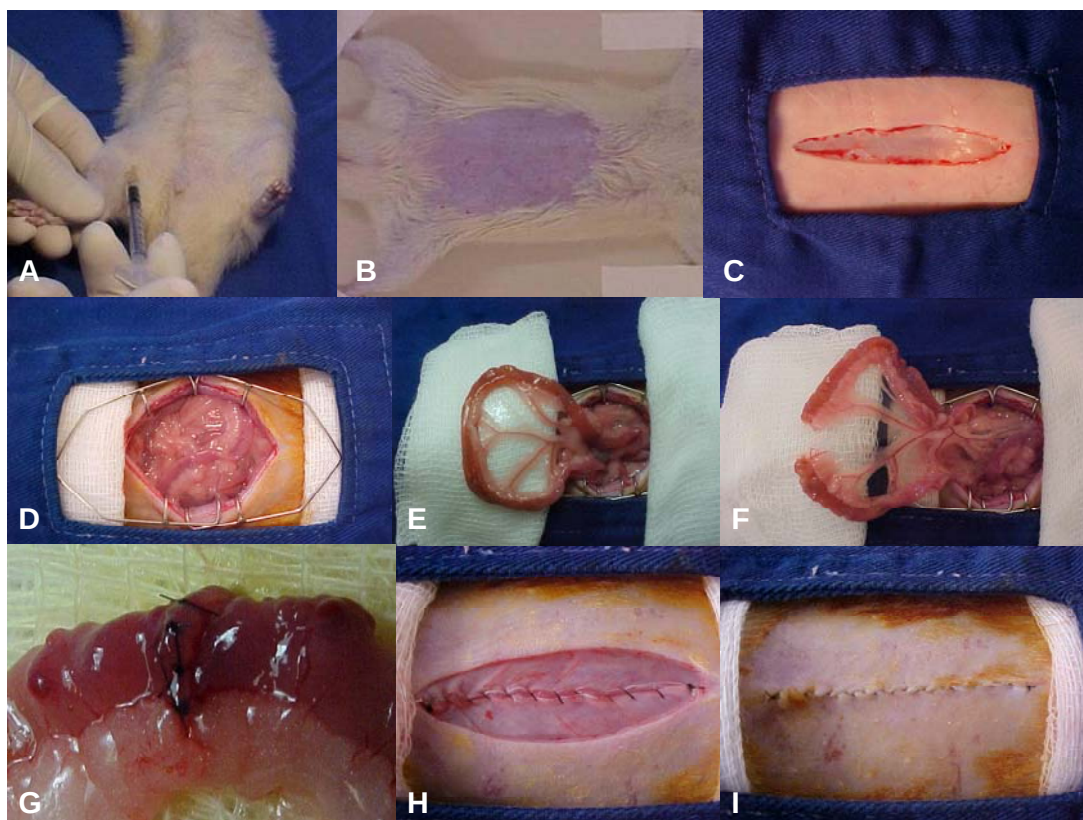


FIGURA 7 -ASPECTO ILUSTRATIVO DAS PRINCIPAIS ETAPAS DA COLOTOMIA:

- A) INDUÇÃO ANESTÉSICA POR VIA INTRA-MUSCULAR.
- B) TRICOTOMIA E FIXAÇÃO NO ANIMAL NA MESA CIRÚRGICA.
- C) DEGERMAÇÃO DA ÁREA ABDOMINAL E INCISÃO ABDOMINAL MEDIANA DE CERCA DE TRÊS CENTÍMETROS DE EXTENSÃO.
- D) EXPOSIÇÃO DAS ALÇAS INTESTINAIS.
- E) EXPOSIÇÃO DO CÓLON.
- F) SECÇÃO A COMPLETA DO CÓLON A APROXIMADAMENTE CINCO CENTÍMETROS DISTAIS DA VÁLVULA ÍLEO-CECAL.
- G) ANASTOMOSE TÉRMINO-TERMINAL, COM OITO PONTOS SEPARADOS COM FIO MONOFILAMENTAR DE NYLON 6.0.
- H) FECHAMENTO DO PLANO MÚSCULO-APONEURÓTICO ATRAVÉS DE SUTURA CONTÍNUA COM FIO MONOFILAMENTAR DE NYLON 3.0 EM DOIS PLANOS.
- I) FECHAMENTO DO PLANO CUTÂNEO ATRAVÉS DE SUTURA CONTÍNUA COM FIO MONOFILAMENTAR DE NYLON 3.0.

3.4.3 Pós-operatório

Foi administrado dipirona por via oral, na dose de 20mg/kg e 10ml de soro fisiológico por via subcutânea e mantidos sob aquecimento até a recuperação anestésica. A seguir os ratos eram relocados em suas caixas devidamente identificadas. Durante as 24 horas seguintes recebiam água suplementada com glicose a 100mg/ml, e mantido o jejum de ração. Após este período passaram a receber ração e água *ad libitum* até o sétimo dia de evolução pós-cirúrgica.

3.5 COLETA DE AMOSTRAS

A coleta de amostras foi feita com os ratos submetidos à sedação por inalação de halotano (Tanohalo-Cristália®) em circuito fechado e a seguir, anestesiados por injeção intramuscular com cloridrato de cetamina (Ketamin-Cristalia®) na dose de 100mg/kg, associada a 10mg/kg de cloridrato de xilasina (Xilazin-Syntec®).

3.5.1 Coleta de sangue

Para a coleta de sangue era realizada punção intra-cardíaca e coletado sangue em seringa de 20 ml com agulha 25x8mm (Beckton-Dickinson) esterilizadas e apirogênicas, em volume de no mínimo 10ml, suficiente para a indução de parada cardíaco-respiratória (apêndice 2).

3.5.2 Coleta de segmento intestinal

Constatada a morte dos animais, estes foram fixados em pranchetas cirúrgicas e reabriu-se a parede abdominal. Examinou-se a cavidade e ressecou-se um segmento do cólon de aproximadamente 4 cm, que continha a anastomose. As peças foram abertas em sentido longitudinal, na borda anti-mesentérica, estendidas em papel filtro, lavadas com jatos de solução fisiológica e separadas em dois fragmentos iguais e identificados. Um dos fragmentos era destinado às dosagens de hidroxiprolina, o qual foi pesado em balança analítica e registrados os pesos em protocolo. O outro fragmento era imerso em frascos numerados com formalina tamponada a 10% para serem submetidas ao processamento histopatológico.

3.6. AVALIAÇÕES

3.6.1 Avaliação ponderal

Todos os ratos foram pesados diariamente em balança analítica, Metler® e seus pesos foram registrados em protocolo.

3.6.2 Avaliação da endotoxemia

Para a avaliação da endotoxemia foram aplicadas avaliações laboratoriais das variáveis hematológicas, das funções hepática e renal, as dosagens de endotoxina circulante e do fator de necrose tumoral alfa.

3.6.2.1 Avaliações hematológicas

3.6.2.1.1 Contagem de leucócitos e plaquetas

Foi utilizado método automatizado através do equipamento Cell-dyn® 3200 System (Abbott).

3.6.2.1.2. Contagem de bastonetes

Foi utilizado método microscópico por contagem porcentual de bastonetes após a coloração de May-Grunwald-Giemsa.

3.6.2.2. Avaliações da função hepática

3.6.2.2.1. Dosagem de bilirrubinas

Foi utilizado método automatizado através do equipamento Selectra II®(Bayer-Vitalab) com reativos específicos para dosagens de bilirrubinas total e direta (HENRY, 1974).

3.6.2.2.2. Dosagem de transaminases

Foi utilizado método automatizado através do equipamento Selectra II®(Bayer-Vitalab) com reativos específicos para dosagens de transaminases glutâmico-pirúvica (TGP) e glutâmico-oxalacética (TGO) (HENRY, 1974).

3.6.2.2.3. Avaliação do tempo de ativação da protrombina (TAP)

Foi utilizado método coagulométrico automatizado utilizando o equipamento Diagnostica Stago (Bayer®) com reativos específicos (Bayer®).

3.6.2.3. Avaliações da função renal

3.6.2.3.1. Dosagem de Uréia

Foi utilizado método automatizado através do equipamento Selectra II®(Bayer-Vitalab) com reativos específicos para dosagens de uréia (HENRY, 1974).

3.6.2.3.2. Dosagem de Creatinina

Foi utilizado método automatizado através do equipamento Selectra II®(Bayer-Vitalab) com reativos específicos para dosagens de creatinina (HENRY, 1974).

3.6.2.4. Dosagem dos níveis séricos de Endotoxina

Para a dosagem de endotoxinas, foi empregado o método do *Limulus Amebocyte Lysate* (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* (apêndice 3).

3.6.2.5. Dosagem imunoenzimática dos níveis séricos do Fator de Necrose Tumoral alfa:

Esta dosagem emprega a técnica imunoenzimática quantitativa, conforme proposição de SPRONG *et al.*, (1997), na qual um anticorpo monoclonal específico anti-TNF α é fixado em placa de Terazaki para posterior captura do antígeno TNF α . Foi empregado o conjunto de reativos BIOTRA Tumor Necrosis Factor ELISA System (Amersham Pharmacia code RPN 2718®).

As amostras de plasma eram distribuídas em cada um dos orifícios da placa, em volumes de 50 μ l, a seguir eram incubadas e submetidas à revelação com anticorpos monoclonais anti-TNF α 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 TNF α na amostra, que será diretamente proporcional à leitura espectrofotométrica (apêndice 4).

3.6.3 Avaliação da cicatrização Intestinal

3.6.3.1 Dosagem de Hidroxiprolina Tecidual

A dosagem de hidroxiprolina tecidual foi realizada por micro-método espectrofotocolorimétrico conforme modificação proposta por Dietz *et al.*, (1995 e 2005) em três etapas principais: a hidrólise ácida das amostras, a oxidação e a formação de pirrol. Realizou-se a hidrólise ácida mediante a adição de ácido clorídrico concentrado em cada um dos tubos que continha a amostra e os tubos com controle positivo (hidroxiprolina) e negativo (água destilada). Em seguida aqueceu-se em banho-maria a 100°C durante 14 horas até a completa solubilização dos fragmentos. Realizou-se a oxidação pela adição de Cloramina T por 30 minutos, em seguida adicionou-se solução de tiosulfato de sódio 3,6M para a sua interrupção e consequente formação do produto da oxidação da hidroxiprolina, o ácido pirrol-1-2-carboxílico. Terminadas as etapas de hidrólise ácida e oxidação, adicionou-se o reativo de Ehrlich e obteve-se a formação final de cor, proporcional ao teor de hidroxiprolina, a ser mensurada em espectrofotômetro. As leituras espectrofotométricas das

amostras eram interpoladas em uma curva de calibração elaborada com três diferentes concentrações de hidroxiprolina submetidas às mesmas fases de processamento das amostras (apêndice 5).

3.6.3.2 Avaliação histométrica da porcentagem de colágeno intestinal maduro e imaturo

Para o processamento das amostras os fios de sutura foram retirados e então efetuados secções perpendiculares ao maior eixo da sutura. Foram encaminhados para processamento histológico, incluindo desidratação, diafanização e emblocamento em parafina. Após microtomia a 4 μ m de espessura, os cortes histológicos foram submetidos à coloração de *picrosirius-red* F3BA.

Para identificação de colágeno maduro e imaturo, os cortes histológicos foram analisados por meio de microscópio óptico da marca Olympus®, em aumento de 400 vezes, utilizando-se fonte de luz polarizada. As imagens foram captadas por câmera Sony® CCDÍRIS, transmitidas a monitor colorido Trinitron Sony®, congeladas e digitalizadas por meio de placas Oculus TCX.

Realizou-se a análise das imagens mediante o aplicativo *Image Pro-Plus* versão 4.5 para *Windows* (RGB), em computador da linha Pentium III® 733MHz. Este programa identifica o tipo de colágeno baseado em cores. Vermelho, amarelo e laranja correspondem a colágeno tipo I (maduro), enquanto que o verde é igual a colágeno tipo III (imaturo). Três campos foram avaliados (superior, médio e inferior) perpendicularmente à anastomose. O resultado foi expresso em área percentual (apêndice 6). Para a avaliação da área, densidade e quantificação dos colágenos tipo I e III, os cortes histológicos foram corados com *sirius-red*. Essa técnica histológica inicialmente foi utilizada por JUNQUEIRA, COSSERMELLI e BRENTANI (1978).

3.6.3.3 Avaliação imunocitoquímica do antígeno nuclear de proliferação celular

Os cortes obtidos conforme descrição do item 3.6.3.2 foram submetidos à reação imunocitoquímica pela técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (Biotin anti-PCNA antibody clone PC10®, Dako), para a pesquisa do antígeno nuclear da proliferação celular (PCNA) de acordo com a técnica de HSU, RAINE e FANGER (1981). Os cortes foram desparafinizados, hidratados e mergulhados em tampão fosfato. Após a recuperação antigênica com tampão citrato e bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 0,3%, os anticorpos primários monoclonais anti-PCNA foram aplicados sobre

os cortes e incubados durante a noite. Em seguida, os cortes foram enxaguados em tampão fosfato e anticorpo secundário biotinilado foi aplicado e incubado por 60 minutos. Após novo enxágüe, o complexo estreptavidina-peroxidase foi aplicado e a reação imuno-histoquímica foi revelada com a aplicação de diaminobenzidina. Após contracoloração com hematoxilina, os cortes foram desidratados, diafanizados e cobertos com lamínulas de vidro com bálsamo do Canadá.

As reações foram consideradas positivas, quando se detectou reação marrom, excluindo-se as prováveis áreas de coloração de fundo com padrão de reação nuclear.

A marcação imunocitoquímica pelo antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) relata o ciclo protéico celular, que aumenta durante a fase G1, atinge o máximo na fase S e persiste com diminuição detectável na fase G2 do ciclo celular. Este método permite a avaliação da proliferação celular. Assim, quantificam-se os núcleos celulares da superfície epitelial e das criptas das glândulas, corados de azul, os quais representam células em repouso e os corados de marrom, que identificam as células em proliferação da fase G1 tardia até a fase M da G2.

Com microscópio óptico e aumento de 1000 X (imersão), utilizando o programa de captura de imagens *Image Pro-Plus*® versão 4.5 – Mídia Cybernetics, contaram-se os núcleos positivos e negativos de dois campos à direita e dois à esquerda da linha de anastomose e de duas criptas glandulares, à direita e à esquerda, nos cortes e obteve-se o percentual dos núcleos positivos e negativos, ou seja, em replicação e em repouso. Cada campo tinha uma área de 7.578,94 μ^2 (apêndice 7).

3.6.3.4 Avaliação histopatológica pela Hematoxilina e Eosina

Os cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (HE) permitiram avaliar não apenas o tipo, mas também a intensidade da reação inflamatória mediante presença de crosta fibrinoleucocitária, proliferação angiofibroblástica, reepitelização de bordas, reação de corpo estranho e microabscesso (STEVENS e LOWE, 2002).

A avaliação da formação do tecido de granulação foi procedida pela pesquisa de crosta fibrinoleucocitária, para a qual buscavam-se locais nos cortes que demonstrassem depósitos de fibrina e células sangüíneas na superfície da ferida, proliferação angiofibroblástica, através da avaliação morfológica de neovascularização (angiogênese), da proliferação de fibroblastos e da reepitelização das bordas dedicando-se especial atenção ao avanço do epitélio em torno da ferida.

A identificação de reação a corpo estranho, foi efetuada através da investigação da formação de agregado granulomatoso, com células gigantes ao redor do fio de sutura e

também a presença de macrófagos. A presença de microabscesso permitiu a avaliação da necrose do tecido mediante visualização de neutrófilos e de macrófagos.

Esses parâmetros foram classificados, de acordo com a intensidade, em ausente, discreta, moderada e receberam uma pontuação citada ao lado de cada item avaliado, tais dados transformados em variáveis quantitativas. Após o estabelecimento de tais índices, realizou-se o somatório e calculou-se a média e o desvio-padrão de cada um desses achados.

TABELA 1 - CRITÉRIOS ADOTADOS PARA AS AVALIAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS PELA COLORAÇÃO DE HEMATOXILINA E EOSINA

Achados	Ausente	Discreta	Moderada
Crosta fibrinoleucocitária	0	1	2
Tecido de Reepitelização de bordas	0	1	2
Granulação Proliferação angiofibroblástica	0	1	2
Reação a corpo estranho	0	1	2
Microabscesso	0	1	2

3.7. AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS

As variáveis avaliadas no estudo foram:

Pesagens: peso inicial, peso no 7º dia (momento da cirurgia) e peso no 14º dia (término do estudo e coleta de amostras).

Endotoxemia: dosagem de endotoxina (LPS), alterações hematológicas (contagens de leucócitos, plaquetas e bastonetes), função renal (dosagens de uréia e creatinina), função hepática (dosagens de bilirrubina total, transaminases e determinação do tempo de ativação da protrombina), dosagem de fator de necrose tumoral alfa.

Cicatrização intestinal: dosagem de hidroxiprolina tecidual, percentuais de colágenos imaturo e maduro (histometria computadorizada após coloração de pricro-sirius), viabilidade celular através da determinação do ciclo protéico celular (imunocitoquímica pelo PCNA) e reações de reparo tecidual (coloração da hematoxilina-eosina).

Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Para a verificação da diferença entre as médias dos pesos usou-se a análise da variância (ANOVA) e nas demais comparações utilizou-se a análise paramétrica com o teste t de Student, através do *software* "GraphPad InStat". Em todos os testes estatísticos, o nível de significância adotado foi $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO PONDERAL

Não ocorreram mortes dos ratos durante o experimento, houve variação nos pesos conforme os grupos e sub-grupos, cujos valores diários e individuais encontram-se descritos nos apêndices 8 e 9. Não foram observadas diferenças entre as médias das pesagens do grupo C em comparação às médias dos sub-grupos SF em T0 ($p=0,9873$ – apêndice 27), T7 ($p=0,5909$, apêndice 28) e em T14 ($p=0,9523$, apêndice 29). Na tabela 2 são demonstradas as comparações entre os sub-grupos SF e LPS nos três períodos de avaliações, cujos resultados diários e individuais estão disponíveis nos apêndices 10, 11 e 12.

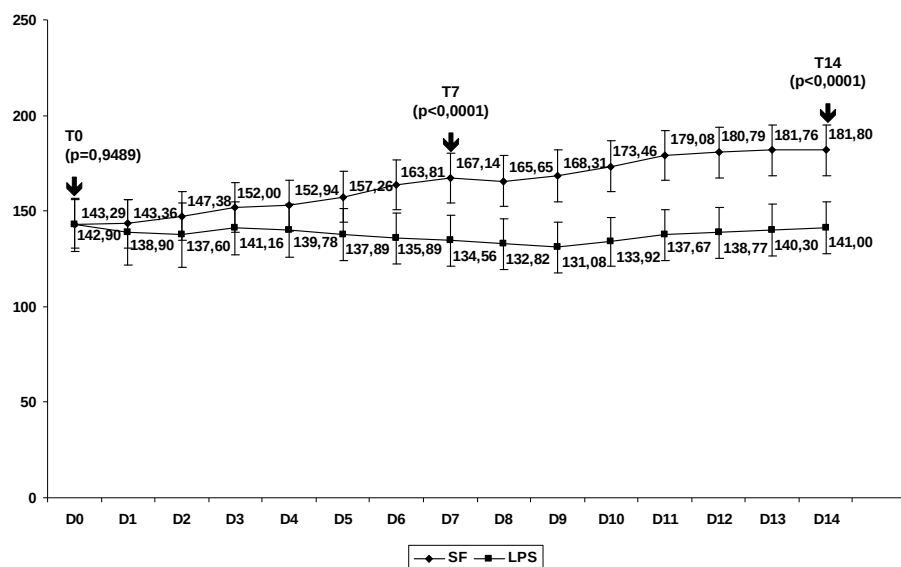
TABELA 2 - COMPARAÇÕES ENTRE AS PESAGENS ($M \pm Dp$ - gramas)

MOMENTOS GRUPOS	GRUPOS						
	PRÉ		PÓS		PRÉ E PÓS		C
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	
Inicial (T0)	143,29± 12,92	142,90± 13,83	143± 11,45	142,30± 16,57	141,70 ±8,54	142,20 ±10,88	142,60 ±7,76
p	0,9489		0,9137		0,9099		
Sétimo dia (7)	167,14± 13,16	134,56± 13,18	171,95± 11,41	170± 19,80	168,58 ±8,49	132,82 ±13,02	172,68 ±7,72
p	0,0000		0,7899		0,0000		
Décimo quarto dia (T14)	181,80± 13,39	141± 13,61	197,99± 15,71	148,60± 20,12	198,10 ±13,33	106,87 ±11,11	198,10 ±11,84
p	0,0000		0,0000		0,0000		

Legenda: PRÉ – grupo inoculado no período pré-cirúrgico, PÓS - grupo inoculado no período pós-cirúrgico, PRÉ E PÓS – grupo inoculado nos períodos pré e pós-cirúrgicos, C – grupo controle, SF – soro fisiológico, LPS –lipopolissacarídeo, DP – desvio padrão, p – significância estatística obtida pelo método de T-Student.

Pode-se observar no gráfico 1, referente ao grupo endotoxemia pré-cirúrgica, que os ratos não apresentaram diferença significativa de pesos em T0 (SF=143,29±12,92 vs LPS=142,9±13,83 gramas, $p=0,9489$). No sétimo dia, ambos os sub-grupos foram submetidos à colotomia e o subgrupo SF apresentou média de peso superior ao subgrupo LPS (SF=167,14±13,16 vs LPS=134,56±13,18 gramas, $p<0,0001$). No período pós-colotomia, no décimo quarto dia o subgrupo SF apresentava 181,8±13,39 gramas, que foi significativamente maior ($p<0,0001$) que a média do subgrupo LPS 141±13,61 gramas, no qual durante este período a inoculação de LPS foi substituída por SF.

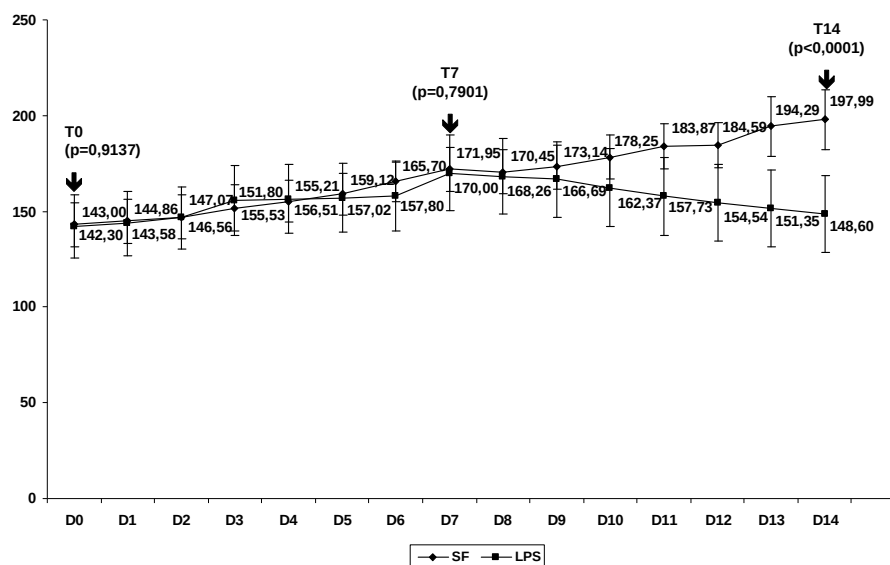
GRÁFICO 1 - VARIAÇÃO PONDERAL DOS RATOS DO GRUPO ENDOTOXEMIA PRÉ-CIRÚRGICA (M±Dp - gramas)



LEGENDA: T0 – INÍCIO, T7 – SÉTIMO DIA, T14 – DÉCIMO QUARTO DIA, D – DIA, SF – GRUPO INOCULADO DIARIAMENTE COM SORO FISIOLÓGICO DURANTE O PERÍODO DE SETE DIAS QUE ANTECEDERAM A COLOTOMIA E NO PERÍODO DE SETE DIAS PÓS-COLOTOMIA, LPS – GRUPO INOCULADO DIARIAMENTE COM 1MG/KG (EV) DE LPS DURANTE O PERÍODO DE SETE DIAS QUE ANTECEDERAM A COLOTOMIA E NO PERÍODO DE SETE DIAS PÓS-COLOTOMIA PASSARAM A SER INOCULADOS DIARIAMENTE COM SORO FISIOLÓGICO EM DOSE PROPORCIONAL AO PESO (EV).

Conforme demonstrado no gráfico 2, pode-se observar no grupo endotoxemia pós-cirúrgica, que os ratos não apresentaram diferença significativa de pesos em T0 (SF=143±11,45 vs LPS=142,3±16,57 gramas, p=0,9137). No sétimo dia, ambos os subgrupos foram submetidos à colotomia e o subgrupo SF apresentou média de peso similar ao subgrupo LPS (SF=171,95±11,41 vs LPS=170±19,8 gramas, p=0,7899). No período pós-colotomia, no décimo quarto dia o subgrupo SF apresentava 197,99±15,71 gramas, que foi significativamente maior (p<0,0001) que a média do subgrupo LPS 148,6±20,12 gramas, no qual, durante este período a inoculação de SF foi substituída por LPS.

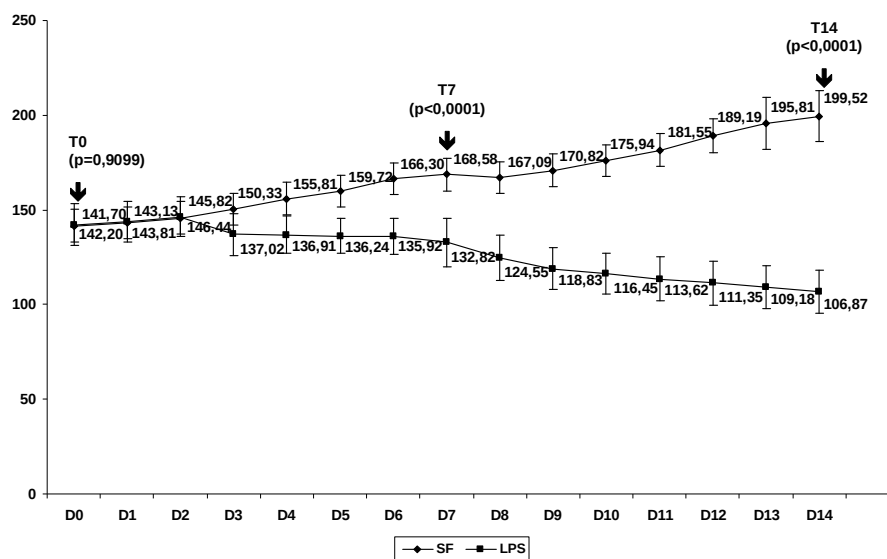
GRÁFICO 2 - VARIAÇÃO PONDERAL DOS RATOS DO GRUPO ENDOTOXEMIA PÓS-CIRÚRGICA



LEGENDA: T0 – INÍCIO, T7 – SÉTIMO DIA, T14 – DÉCIMO QUARTO DIA, D – DIA, SF – GRUPO INOCULADO DIARIAMENTE COM SORO FISIOLÓGICO DURANTE O PERÍODO DE SETE DIAS QUE ANTECEDERAM A COLOTOMIA E NO PERÍODO DE SETE DIAS PÓS-COLOTOMIA, LPS – GRUPO INOCULADO DIARIAMENTE COM 1MG/KG (EV) DE LPS DURANTE O PERÍODO DE SETE DIAS QUE ANTECEDERAM A COLOTOMIA E NO PERÍODO DE SETE DIAS PÓS-COLOTOMIA PASSARAM A SER INOCULADOS DIARIAMENTE COM SORO FISIOLÓGICO EM DOSE PROPORCIONAL AO PESO (EV).

No gráfico 3, observa-se que no grupo endotoxemia pré e pós-cirúrgica, que os ratos não apresentaram diferença significativa de pesos em T0 (SF=141,7±8,54 vs LPS=142,2±10,88 gramas, p=0,9099). No sétimo dia, ambos os sub-grupos foram submetidos à colotomia e o subgrupo SF apresentou média de peso superior ao subgrupo LPS (SF=168,58±8,49 vs LPS=132,8±13,02 gramas, p<0,0001). No período pós-colotomia, no décimo quarto dia o subgrupo SF apresentava 199,52 ±13,33 gramas, que foi significativamente maior (p<0,0001) que a média do subgrupo LPS 106,87±11,1 gramas.

GRÁFICO 3 - VARIAÇÃO PONDERAL DOS RATOS DO GRUPO ENDOTOXEMIA PRÉ E PÓS-CIRÚRGICA



LEGENDA: T0 – INÍCIO, T7 – SÉTIMO DIA, T14 – DÉCIMO QUARTO DIA, D – DIA, SF – GRUPO INOCULADO DIARIAMENTE COM SORO FISIOLÓGICO DURANTE O PERÍODO DE SETE DIAS QUE ANTECEDERAM A COLOTOMIA E NO PERÍODO DE SETE DIAS PÓS-COLOTOMIA, LPS – GRUPO INOCULADO DIARIAMENTE COM 1MG/KG (EV) DE LPS DURANTE O PERÍODO DE SETE DIAS QUE ANTECEDERAM A COLOTOMIA E NO PERÍODO DE SETE DIAS PÓS-COLOTOMIA PASSARAM A SER INOCULADOS DIARIAMENTE COM SORO FISIOLÓGICO EM DOSE PROPORCIONAL AO PESO (EV).

Os ratos do grupo endotoxemia pré e pós-cirúrgica, sub-grupo LPS, apresentavam-se no décimo quarto dia prostrados, com pilo-ereção e blefarite sanguinolenta, conforme a figura 6.

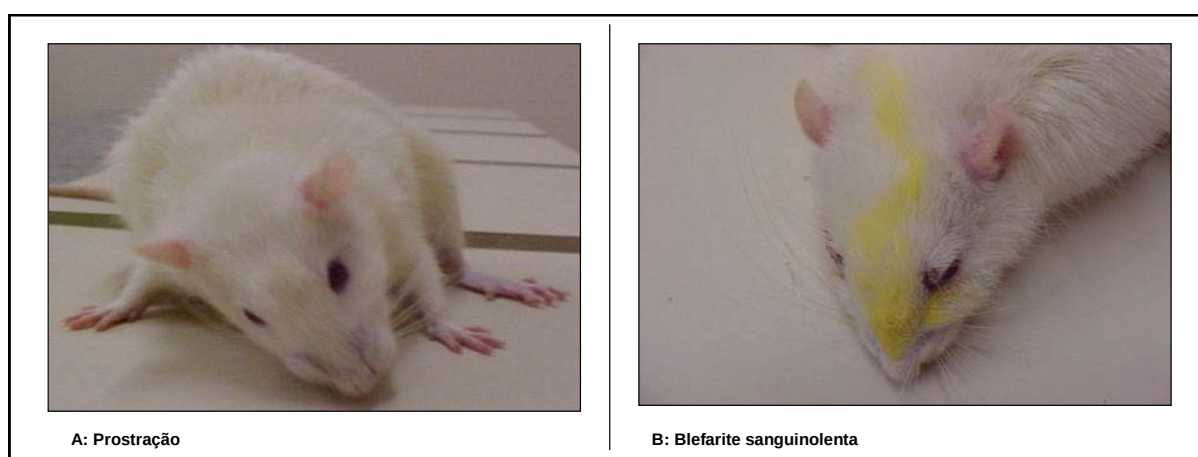


FIGURA 8 - ASPECTO ILUSTRATIVO DOS RATOS DO GRUPO ENDOTOXEMIA PRÉ E PÓS-CIRÚRGICA, NO D14, DEMONSTRANDO PROSTRAÇÃO E BLEFARITE SANGUINOLENTA.

4.2 AVALIAÇÃO DA ENDOTOXEMIA

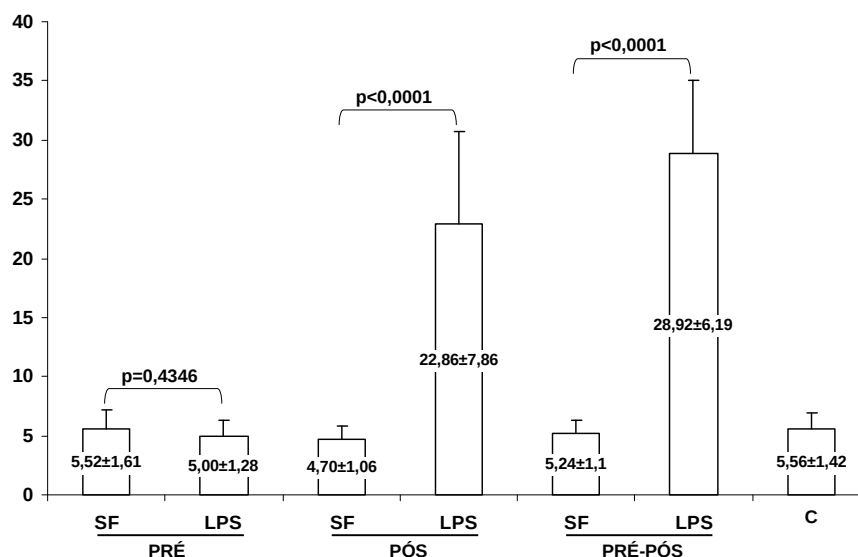
4.2.1 Avaliações hematológicas:

Para as avaliações hematológicas foram comparados os valores obtidos nas contagens totais de leucócitos, plaquetas e bastonetes.

A média das contagens totais de leucócitos no T14 do grupo controle ($5,56 \pm 1,42 \times 10^3$ leucócitos/mm³) não diferiram dos sub-grupos SF dos grupos pré ($5,52 \pm 1,61 \times 10^3$ leucócitos/mm³, $p=0,9726$), do grupo pós ($4,7 \pm 1,06 \times 10^3$ leucócitos/mm³, $p=0,0663$) e do grupo pré e pós ($5,24 \pm 1,1 \times 10^3$ leucócitos/mm³, $p=0,5117$).

Conforme demonstrado no gráfico 4, pode-se observar no T14, que nos sub-grupos do grupo endotoxemia pré-cirúrgica não houve diferença significativa na contagem de leucócitos ($p=0,4346$). No grupo endotoxemia pós-cirúrgica, o subgrupo LPS apresentou média de contagem de leucócitos significativamente maior que o subgrupo SF ($p<0,0001$) e no grupo endotoxemia pré e pós o sub-grupo LPS demonstrou contagem média de leucócitos significativamente maior ($p<0,0001$) que a média do subgrupo SF. As contagens individuais de leucócitos estão disponíveis no apêndice 13.

GRÁFICO 4 - DEMONSTRATIVOS DAS CONTAGENS TOTAIS DE LEUCÓCITOS ($\times 10^3/\text{mm}^3$)



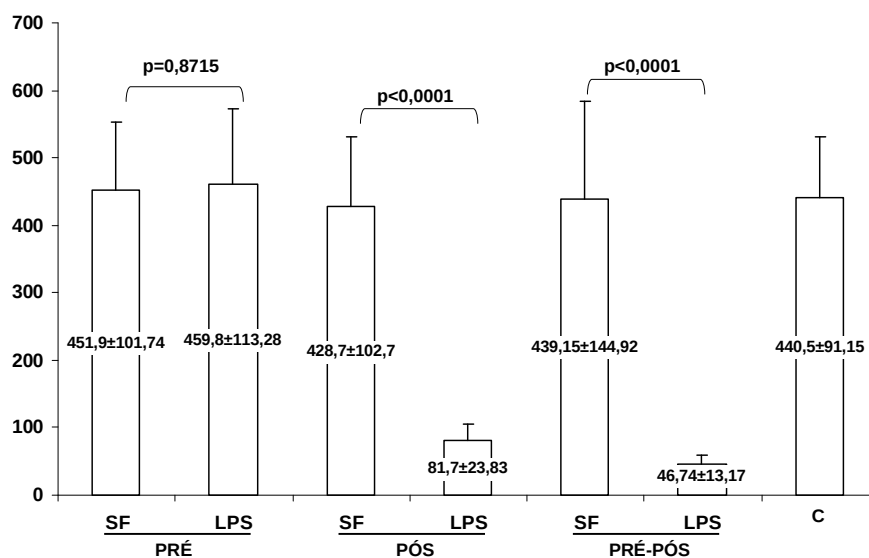
LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS – GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS – LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

Quanto às contagens de plaquetas no T14 do grupo controle ($440,5 \pm 91,15 \times 10^3$ plaquetas/mm³), não diferiram dos sub-grupos SF dos grupos pré ($451,9 \pm 101,7 \times 10^3$

plaquetas/mm³, $p=0,7688$), do grupo pós ($428,7 \pm 102,7 \times 10^3$ plaquetas/mm³, $p=0,7741$) e do grupo pré e pós ($439,2 \pm 144,9 \times 10^3$ plaquetas/mm³, $p=0,0,9838$).

Conforme demonstrado no gráfico 5, pode-se observar no T14, que nos sub-grupos do grupo endotoxemia pré-cirúrgica não houve diferença significativa na contagem de plaquetas ($p=0,8715$). No grupo endotoxemia pós-cirúrgica, o subgrupo LPS apresentou média de contagem de plaquetas significativamente maior que o subgrupo SF ($p<0,0001$) e no grupo endotoxemia pré e pós o sub-grupo LPS demonstrou contagem média de plaquetas significativamente maior ($p<0,0001$) que a média do subgrupo SF. As contagens individuais de plaquetas estão disponíveis no apêndice 14.

GRÁFICO 5 - DEMONSTRATIVOS DAS CONTAGENS DE PLAQUETAS ($\times 10^3$)/ML

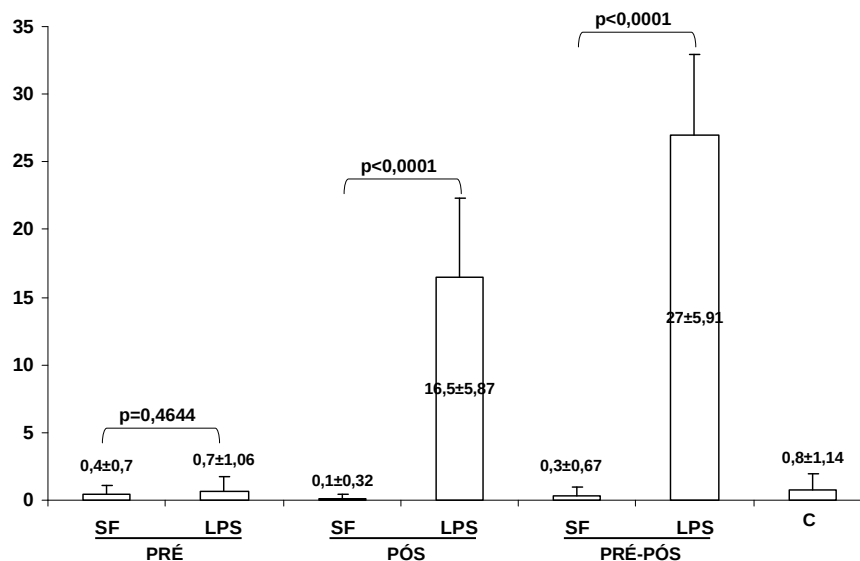


LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS – GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS –LIOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

Em relação às porcentagens de bastonetes no T14 do grupo controle ($0,8 \pm 1,03\%$), não diferiram dos sub-grupos SF dos grupos pré ($0,4 \pm 0,7$, $p=0,3239$), do grupo pós ($0,1 \pm 0,32$, $p=0,0553$) e do grupo pré e pós ($0,3 \pm 0,67$, $p=0,2163$).

Conforme demonstrado no gráfico 6, pode-se observar no T14, que nos sub-grupos do grupo endotoxemia pré-cirúrgica não houve diferença significativa na porcentagem de bastonetes ($p=0,4645$). No grupo endotoxemia pós-cirúrgica, o subgrupo LPS apresentou média de porcentagem de bastonetes significativamente maior que o subgrupo SF ($p<0,0001$) e no grupo endotoxemia pré e pós o sub-grupo LPS demonstrou contagem média de porcentagem de bastonetes significativamente maior ($p<0,0001$) que a média do subgrupo SF. As contagens individuais de bastonetes estão disponíveis no apêndice 15.

GRÁFICO 6 - DEMONSTRATIVOS DAS CONTAGENS PORCENTUAIS DE BASTONETES



LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS – GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS –LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

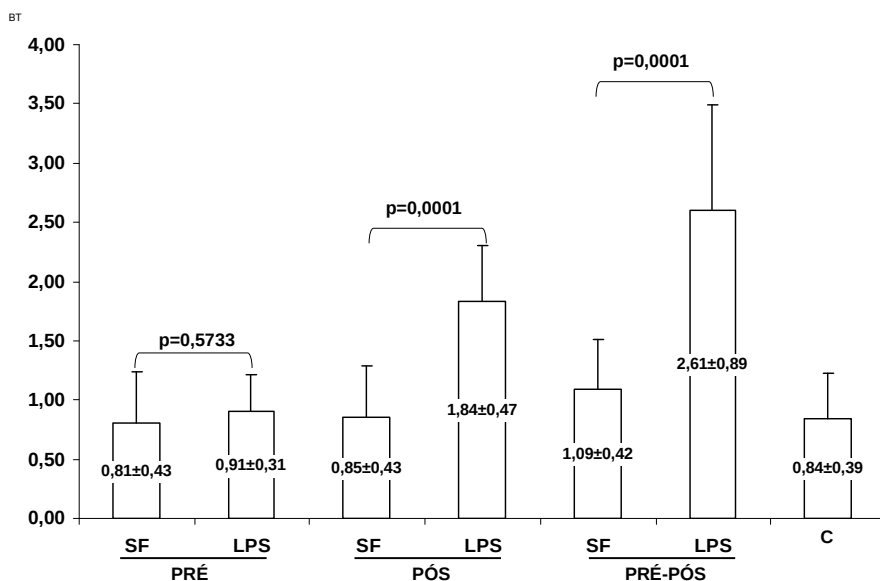
4.2.2 Avaliações da função hepática

Para as avaliações da função hepática foram comparados os valores obtidos nas dosagens de bilirrubina total (apêndice 16), transaminases glutâmica-oxalacética (TGO – apêndice 17), glutâmica pirúvica e o tempo de ativação da protrombina.

As dosagens de bilirrubina total no T14 do grupo controle ($0,84\pm0,39\text{mg/dl}$), não diferiram dos sub-grupos SF dos grupos pré ($0,81\pm0,43$, $p=0,8666$), do grupo pós ($0,85\pm0,43$, $p=0,9528$) e do grupo pré e pós ($1,09\pm0,42$, $p=0,1830$).

Conforme demonstrado no gráfico 7, pode-se observar no T14, que nos sub-grupos do grupo endotoxemia pré-cirúrgica não houve diferença significativa na dosagem de bilirrubina total ($p=0,5733$). No grupo endotoxemia pós-cirúrgica, o subgrupo LPS apresentou média da dosagem de bilirrubina total significativamente maior que o subgrupo SF ($p=0,0001$) e no grupo endotoxemia pré e pós o sub-grupo LPS demonstrou dosagem média de bilirrubina total significativamente maior ($p=0,0001$) que a média do subgrupo SF. As dosagens individuais de bilirrubinas estão disponíveis no apêndice 16.

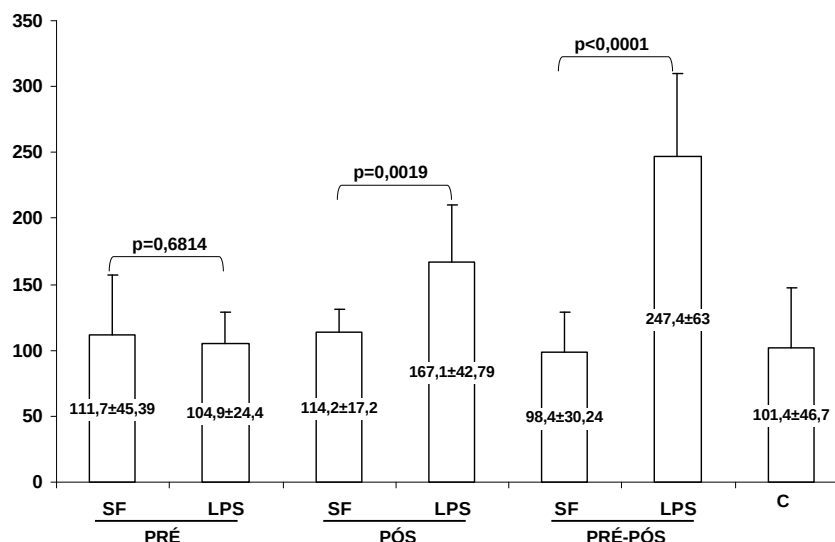
GRÁFICO 7 - DEMONSTRATIVO DAS DOSAGENS DE BILIRRUBINAS TOTAIS (mg/dl)



LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS – GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS –LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

As dosagens de TGO no T14 do grupo controle ($101,4 \pm 46,7 \text{ u/L}$), não diferiram dos sub-grupos SF dos grupos pré ($111,7 \pm 45,397 \text{ u/L}$, $p=0,6207$), do grupo pós ($114,2 \pm 17,27 \text{ u/L}$, $p=0,4212$) e do grupo pré e pós ($98,4 \pm 30,247 \text{ u/L}$, $p=0,8652$). Conforme demonstrado no gráfico 8, pode-se observar no T14, que nos sub-grupos do grupo endotoxemia pré-cirúrgica não houve diferença significativa na dosagem de TGO ($p=0,6814$). No grupo endotoxemia pós-cirúrgica, o subgrupo LPS apresentou média da dosagem de TGO significativamente maior que o subgrupo SF ($p=0,0019$) e no grupo endotoxemia pré e pós o sub-grupo LPS demonstrou dosagem média de TGO significativamente maior ($p<0,0001$) que a média do subgrupo SF. As dosagens individuais de TGO estão disponíveis no apêndice 17.

GRÁFICO 8 - DEMONSTRATIVO DAS DOSAGENS DOSAGEM DE TGO (U/L)

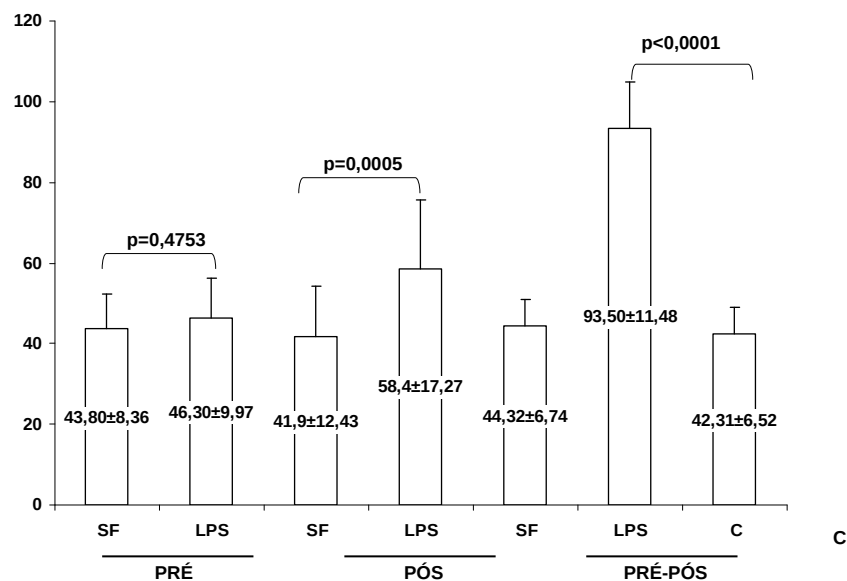


LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS – GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS –LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

As dosagens de TGP no T14 do grupo controle ($42,31 \pm 6,52 \text{ u/L}$), não diferiram dos sub-grupos SF dos grupos pré ($43,8 \pm 8,36 \text{ u/L}$, $p=0,7530$), do grupo pós ($41,9 \pm 12,43 \text{ u/L}$, $p=0,8102$) e do grupo pré e pós ($44,32 \pm 6,74 \text{ u/L}$, $p=0,5997$).

Conforme demonstrado no gráfico 9, pode-se observar no T14, que nos sub-grupos do grupo endotoxemia pré-cirúrgica não houve diferença significativa na dosagem de TGP ($p=0,4753$). No grupo endotoxemia pós-cirúrgica, o subgrupo LPS apresentou média da dosagem de TGP significativamente maior que o subgrupo SF ($p=0,0005$) e no grupo endotoxemia pré e pós o sub-grupo LPS demonstrou dosagem média de TGP significativamente maior ($p<0,0001$) que a média do subgrupo SF. As dosagens individuais de TGP estão disponíveis no apêndice 18.

GRÁFICO 9 - DEMONSTRATIVO DAS DOSAGENS DE TGP (U/L)

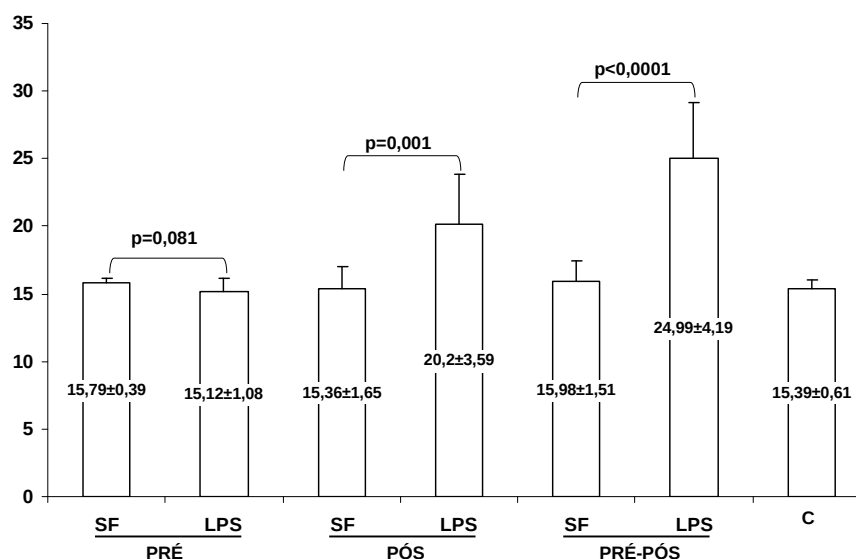


LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS – GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS –LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

As determinações do TAP no T14 do grupo controle ($15,39 \pm 0,61$ segundos), não diferiram dos sub-grupos SF dos grupos pré ($15,79 \pm 0,39$ segundos, $p=0,1329$), do grupo pós ($15,36 \pm 1,65$ segundos, $p=0,9723$) e do grupo pré e pós ($15,98 \pm 1,51$ segundos, $p=0,2722$).

Conforme demonstrado no gráfico 10, pode-se observar no T14, que nos sub-grupos do grupo endotoxemia pré-cirúrgica não houve diferença significativa nas determinações do TAP ($p=0,081$). No grupo endotoxemia pós-cirúrgica, o subgrupo LPS apresentou média do TAP significativamente maior que o subgrupo SF ($p=0,0001$) e no grupo endotoxemia pré e pós o sub-grupo LPS demonstrou dosagem média do TAP significativamente maior ($p<0,0001$) que a média do subgrupo SF. As dosagens individuais do TAP estão disponíveis no apêndice 19.

GRÁFICO 10 - DEMONSTRATIVO DA AVALIAÇÃO DO TEMPO DE ATIVAÇÃO DA PROTROMBINA (TAP – segundos)



LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS – GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS –LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

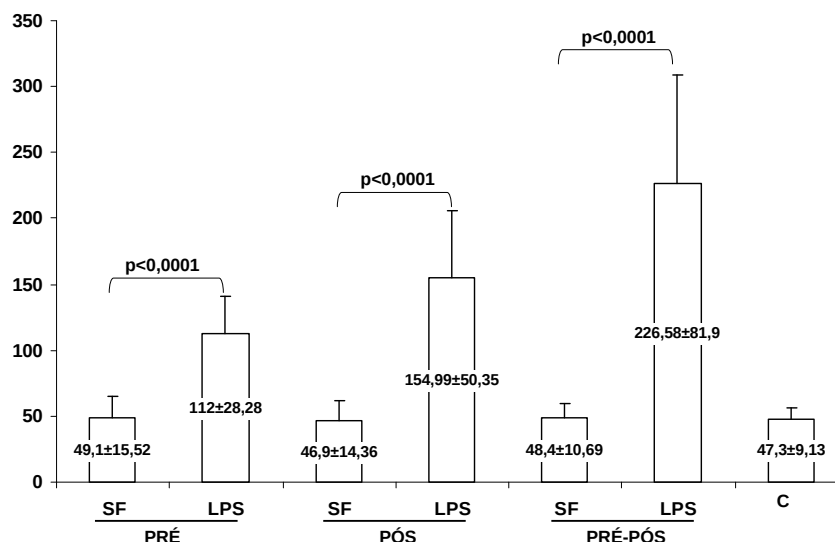
4.2.3 Avaliações da função renal

Para as avaliações da função renal foram comparados os valores obtidos nas dosagens de uréia e creatinina.

As dosagens de uréia no T14 do grupo controle ($47,3 \pm 9,13$ mg/ml), não diferiram dos sub-grupos SF dos grupos pré ($49,1 \pm 15,52$ mg/ml, $p=0,7556$), do grupo pós ($46,9 \pm 14,39$ mg/ml, $p=0,9416$) e do grupo pré e pós ($48,4 \pm 10,69$ mg/ml, $p=0,8074$).

Conforme demonstrado no gráfico 11, pode-se observar no T14, que nos sub-grupos do grupo endotoxemia pré-cirúrgica houve diferença significativa nas dosagens de uréia ($p<0,0001$). No grupo endotoxemia pós-cirúrgica, o subgrupo LPS apresentou média das dosagens de uréia significativamente maior que o subgrupo SF ($p<0,0001$) e no grupo endotoxemia pré e pós o sub-grupo LPS demonstrou dosagem média de uréia significativamente maior ($p<0,0001$) que a média do subgrupo SF. As dosagens individuais de uréia estão disponíveis no apêndice 20.

GRÁFICO 11 - DEMONSTRATIVO DAS DOSAGENS DE URÉIA (mg/dl)

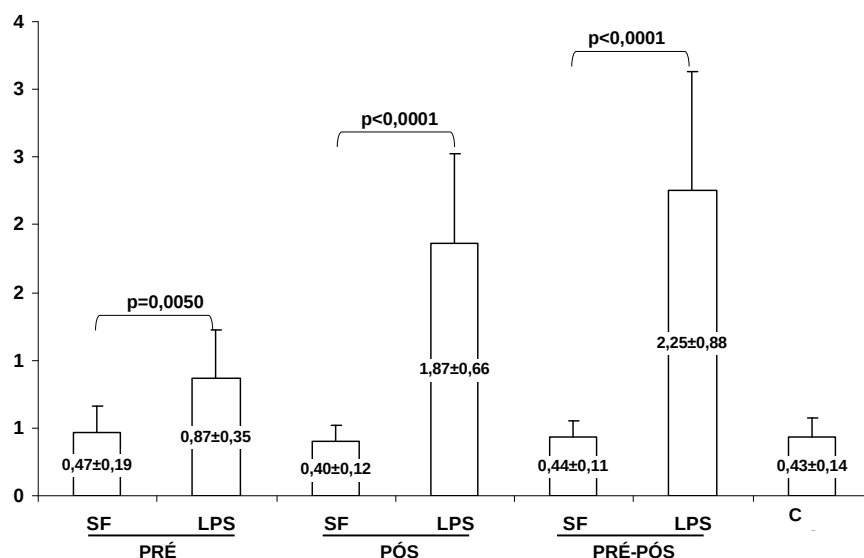


LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS – GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS –LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

As dosagens de creatinina no T14 do grupo controle ($0,43 \pm 0,14$ mg/ml), não diferiram dos sub-grupos SF dos grupos pré ($0,47 \pm 0,19$ mg/ml, $p=0,7556$), do grupo pós ($0,40 \pm 0,12$ mg/ml, $p=0,9416$) e do grupo pré e pós ($0,44 \pm 0,11$ mg/ml, $p=0,8074$).

Conforme demonstrado no gráfico 12, pode-se observar no T14, que nos sub-grupos do grupo endotoxemia pré-cirúrgica houve diferença significativa nas dosagens de creatinina ($p=0,0050$). No grupo endotoxemia pós-cirúrgica, o subgrupo LPS apresentou média das dosagens de creatinina significativamente maior que o subgrupo SF ($p<0,0001$) e no grupo endotoxemia pré e pós o sub-grupo LPS demonstrou dosagem média de creatinina significativamente maior ($p<0,0001$) que a média do subgrupo SF. As dosagens individuais de creatinina estão disponíveis no apêndice 21.

GRÁFICO 12 - DEMONSTRATIVO DAS DOSAGENS DE CREATININA (mg/dl)



LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS – GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS –LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

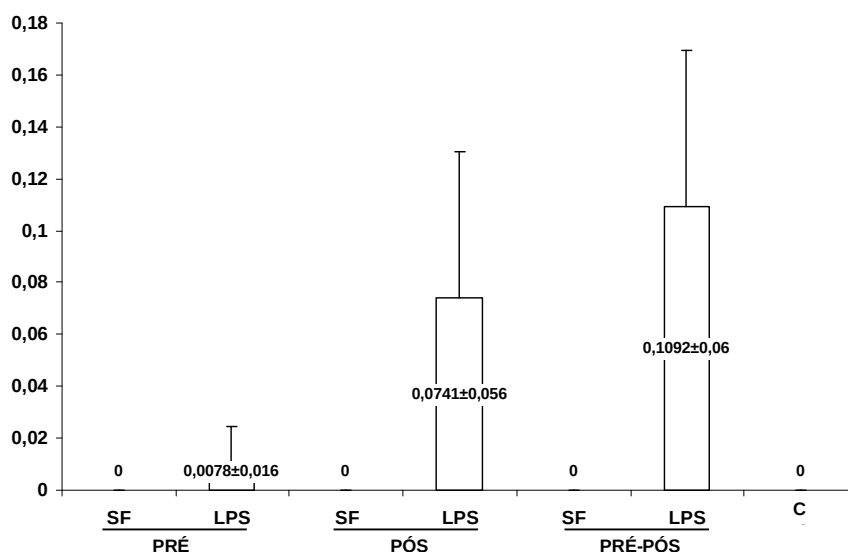
4.2.4 Avaliação dos níveis séricos de endotoxina

Para as avaliações imunológicas foram comparados os valores obtidos nas dosagens de endotoxina (LPS) e $\text{TNF}\alpha$.

Não houve detecção de endotoxina no T14 no grupo controle e nos sub-grupos SF dos grupos pré, pós e pré e pós.

Conforme demonstrado no gráfico 13, houve detecção de endotoxina circulante no T14 nos sub-grupos LPS do grupo endotoxemia pré-cirúrgica ($0,0078 \pm 0,016 \text{ uE/ml}$), do grupo endotoxemia pós-cirúrgica ($0,0741 \pm 0,056 \text{ uE/ml}$) e no grupo endotoxemia pré e pós ($0,1092 \pm 0,06 \text{ uE/ml}$). As dosagens individuais de endotoxina estão disponíveis no apêndice 22.

GRÁFICO 13 - DEMONSTRATIVO DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINA (LPS – unidades endotóxicas /ml – UE/ml)

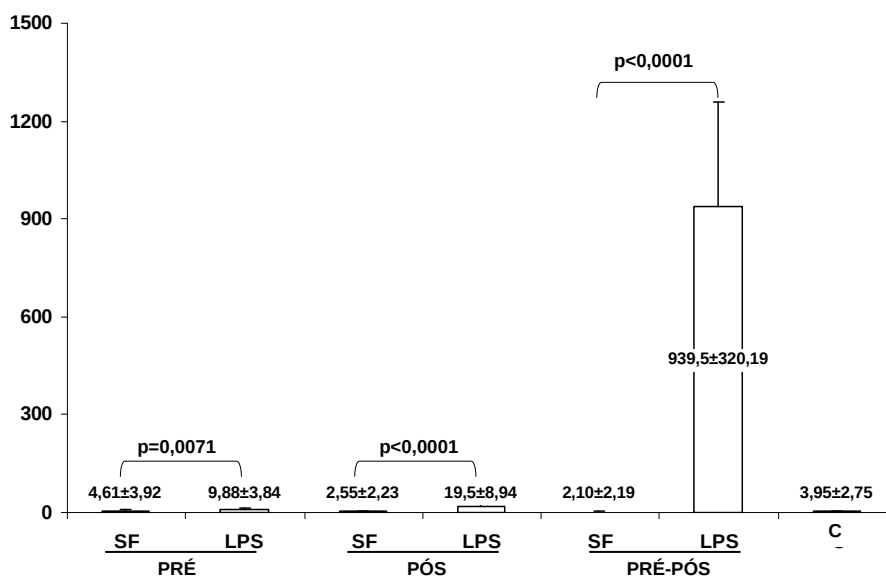


LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS – GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS –LIPOPOLISSACARÍDEO.

4.2.5 Avaliação dos níveis séricos de $\text{TNF}\alpha$

As dosagens de $\text{TNF}\alpha$ no T14 do grupo controle ($3,95 \pm 2,75$ pg/ml), não diferiram dos sub-grupos SF dos grupos pré ($4,61 \pm 3,92$ pg/ml, $p=0,6183$), do grupo pós ($2,55 \pm 2,23$ pg/ml, $p=0,1446$) e do grupo pré e pós ($2,10 \pm 2,19$ pg/ml, $p=0,0555$).

Conforme demonstrado no gráfico 14, pode-se observar no T14, que nos sub-grupos do grupo endotoxemia pré-cirúrgica houve diferença significativa nas dosagens de $\text{TNF}\alpha$ ($p=0,0071$). No grupo endotoxemia pós-cirúrgica, o subgrupo LPS apresentou média das dosagens de $\text{TNF}\alpha$ significativamente maior que o subgrupo SF ($p<0,0001$) e no grupo endotoxemia pré e pós o sub-grupo LPS demonstrou dosagem média de $\text{TNF}\alpha$ significativamente maior ($p<0,0001$) que a média do subgrupo SF. As dosagens individuais de $\text{TNF}\alpha$ estão disponíveis no apêndice 23.

GRÁFICO 14 - DEMONSTRATIVO DAS DOSAGENS DE $\text{TNF}\alpha$ (picogramas/ml)

LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS – GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS –LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

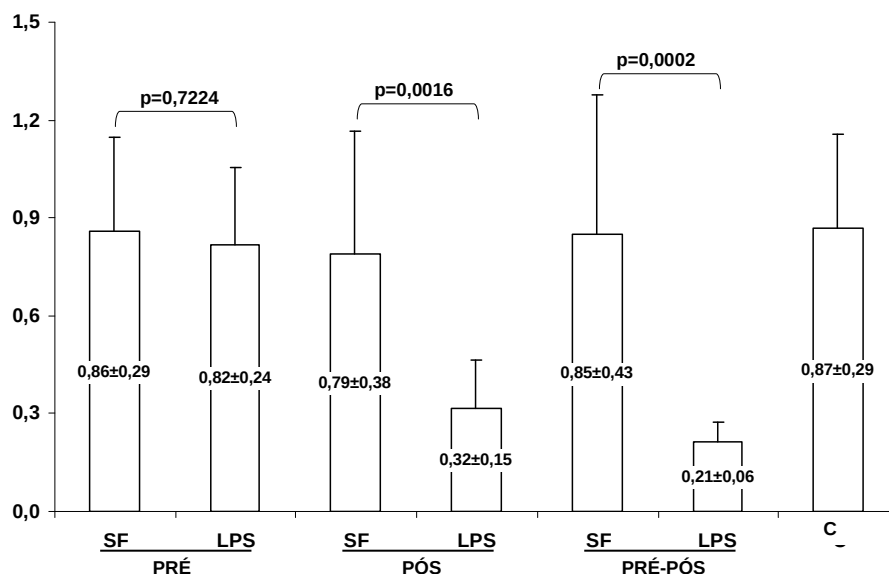
4.3 AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO INTESTINAL

4.3.1 Dosagem de hidroxiprolina tecidual

As dosagens teciduais de hidroxiprolina no T14 do grupo controle ($0,87 \pm 0,29 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína), não diferiram dos sub-grupos SF dos grupos pré ($0,86 \pm 0,29 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, $p=0,9190$), do grupo pós ($0,79 \pm 0,38 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, $p=0,5556$) e do grupo pré e pós ($0,85 \pm 0,43 \mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína, $p=0,9080$).

Conforme demonstrado no gráfico 15, pode-se observar no T14, que nos sub-grupos do grupo endotoxemia pré-cirúrgica não houve diferença significativa nas dosagens teciduais de hidroxiprolina ($p=0,7224$). No grupo endotoxemia pós-cirúrgica, o subgrupo LPS apresentou média das dosagens teciduais de hidroxiprolina significativamente menores que o subgrupo SF ($p=0,0016$) e no grupo endotoxemia pré e pós o sub-grupo LPS demonstrou dosagem média tecidual de hidroxiprolina significativamente menor ($p=0,0002$) que a média do subgrupo SF. As dosagens individuais de teciduais de hidroxiprolina estão disponíveis no apêndice 24.

GRÁFICO 15 - DEMONSTRATIVO DAS DOSAGENS TECIDUAIS DE HIDROXIPROLINA (microgramas/mg de tecido intestinal)



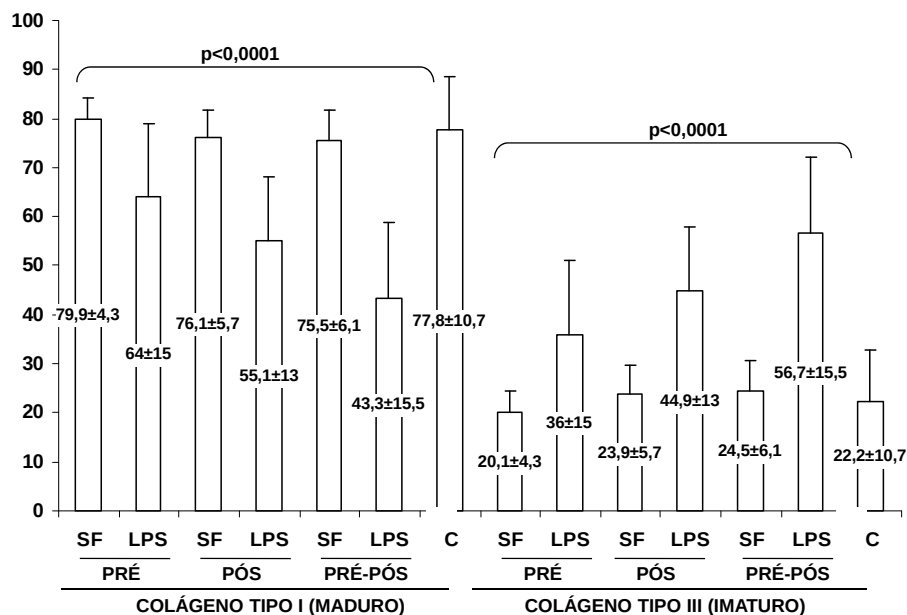
LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS – GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS –LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

4.3.2. Avaliação histométrica da porcentagem de colágenos intestinais maduro e imaturo

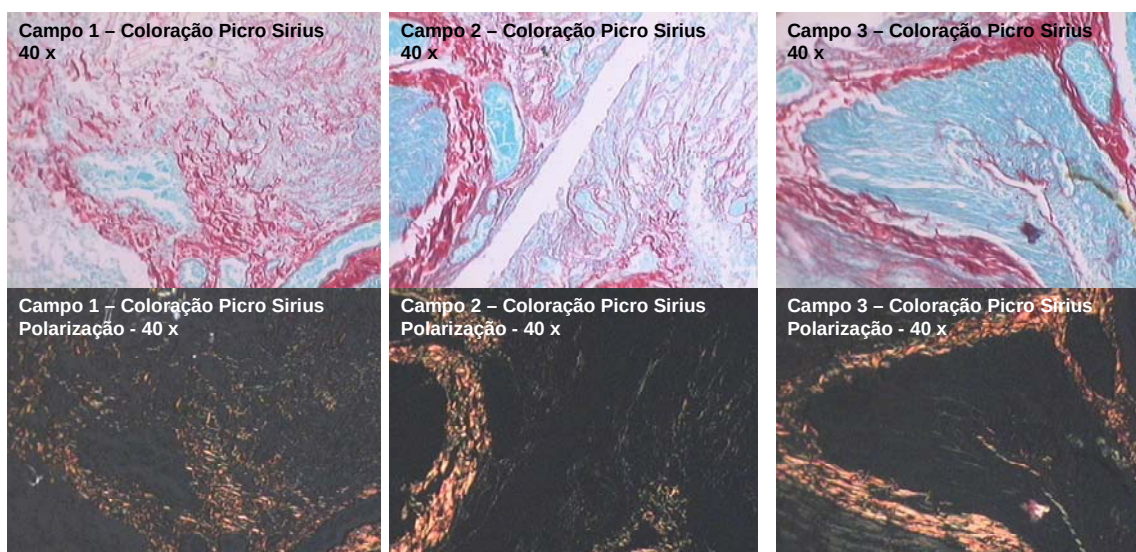
O grupo controle não diferiu quanto às porcentagens de colágeno maduro ($77,8 \pm 10,7\%$) e imaturo ($22,2 \pm 10,7\%$) no T14 dos sub-grupos SF respectivamente, dos grupos pré (maduro= $79,9 \pm 4,3\%$, $p=0,1810$; imaturo= $17,1 \pm 4,5\%$, $p=0,5711$), dos grupos pós (maduro= $76,1 \pm 5,7\%$, $p=0,8513$; imaturo= $23 \pm 7,9\%$, $p=0,6625$) e dos grupos pré e pós (maduro= $75,5 \pm 6,1\%$, $p=0,5620$; imaturo= $24,5 \pm 6,1\%$, $p=0,4853$).

Conforme demonstrado no gráfico 16, pode-se observar no T14 diminuição significativa na porcentagem de colágeno maduro (tipo I) nos sub-grupos inoculados com LPS em comparação com os sub-grupos inoculados com SF, grupo pré $p=0,0047$, grupo pós $p=0,0002$, grupo pré-pós $p<0,0001$. De maneira inversa, quanto às porcentagens médias de colágeno imaturo observaram-se diminuições nos sub-grupos inoculados com SF em comparação aos inoculados com LPS, grupo pré $p=0,0031$, grupo pós $p=0,0012$, grupo pré-pós $p<0,0001$. A figura 4 demonstra a diferenciação entre colágeno maduro e imaturo pela coloração de picro-sirius. As porcentagens individuais de colágenos maduro e imaturo estão disponíveis no apêndice 25.

GRÁFICO 16 - DEMONSTRATIVO DAS AVALIAÇÕES HISTOMÉTRICAS DA MATURAÇÃO DE COLÁGENO EM PORCENTAGEM DE COLÁGENO TIPO III – IMATURO E TIPO I – MADURO:



LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS – GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS –LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.



1	COLOTOMIA - GRUPO ENDOTOXEMIA PRÉ - SUB-GRUPO LPS					
2	Campo 01					
3	Range	Objects	% Objects	% Área	Cálculos	%
4	I	627	23,849373	68,991936	Mx	I 60,60
5	III	2002	76,150627	31,008062		III 39,40
6	Campo 02					
7	Range	Objects	% Objects	% Área		
8	I	1230	31,522297	46,396519		
9	III	2672	68,477707	53,603481		
10	Campo 03					
11	Range	Objects	% Objects	% Área		
12	I	804	31,174873	66,405487		
13	III	1775	68,825127	33,594513		

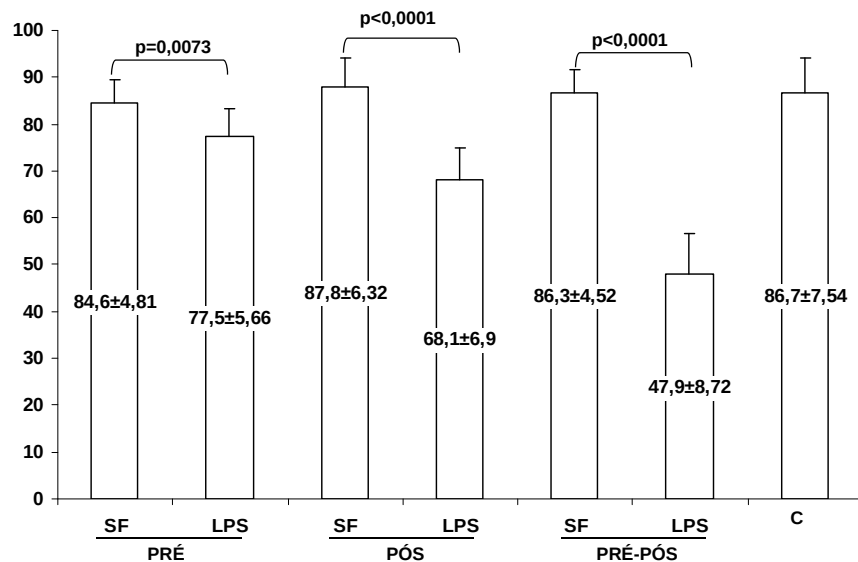
FIGURA 9 - CORTE HISTOLÓGICO CORADO PELO MÉTODO SIRIUS RED F3BA (40X) EVIDENCIANDO EM VERMELHO O COLÁGENO TIPO I) E EM AZUL-VERDE O COLÁGENO TIPO III.

4.3.3. Avaliação imunocitoquímica do antígeno nuclear de proliferação celular

As porcentagens de células PCNA positivas no T14 do grupo controle ($86,7 \pm 7,54\%$) não diferiram dos sub-grupos SF dos grupos pré ($84,6 \pm 4,81\%$, $p=0,4675$), do grupo pós ($87,8 \pm 6,32\%$, $p=0,7279$) e do grupo pré e pós ($86,3 \pm 4,52\%$, $p=0,8872$).

Conforme demonstrado no gráfico 17, pode-se observar no T14, que nos sub-grupos do grupo endotoxemia pré-cirúrgica houve diferença significativa nas porcentagens de células PCNA positivas ($p=0,0073$). No grupo endotoxemia pós-cirúrgica, o subgrupo LPS apresentou média das porcentagens de células PCNA positivas significativamente menor que o subgrupo SF ($p<0,0001$) e no grupo endotoxemia pré e pós o sub-grupo LPS demonstrou porcentagens médias de células PCNA positivas significativamente menor ($p<0,0001$) que a média do subgrupo SF. A figura 5 demonstra a diferenciação de células PCNA positivas e negativas. As porcentagens individuais médias de células PCNA positivas estão disponíveis no apêndice 26.

GRÁFICO 17 - DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÃO ENTRE AS PORCENTAGENS OBTIDAS NA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DA VIABILIDADE CELULAR DA REEPITELIZAÇÃO CICATRICIAL – CÉLULAS PCNA POSITIVAS



LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS – GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS –LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

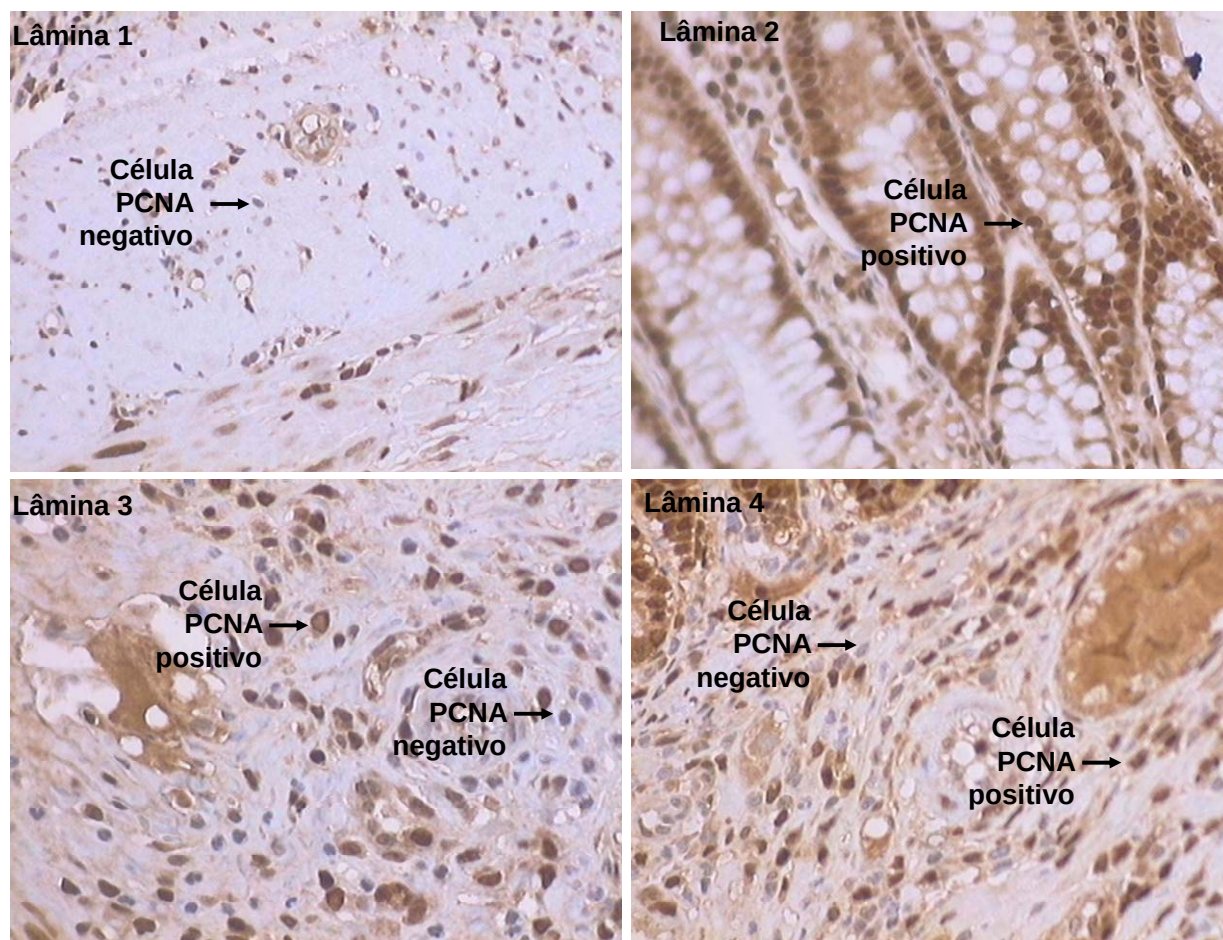


FIGURA 10 - ASPECTO ILUSTRATIVO DE CORTE HISTOLÓGICO DE INTESTINO DE RATO SOB COLORAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA COM PCNA ONDE SE OBSERVAM NÚCLEOS CELULARES DA SUPERFÍCIE EPITELIAL E DAS CRIPTAS DAS GLÂNDULAS, CORADOS DE AZUL, OS QUAIS REPRESENTAM CÉLULAS EM REPOUSO E OS CORADOS EM MARROM, QUE IDENTIFICAM AS CÉLULAS EM PROLIFERAÇÃO DA FASE G1 TARDIA ATÉ A FASE M DA G2.

4.3.4. Avaliação histopatológica

As avaliações histopatológicas das anastomoses estão descritas nas tabelas 3, 4 e 5. Nos sub-grupos SF e LPS do grupo endotoxemia pré-cirúrgica foram semelhantes os escores obtidos nas avaliações da formação de tecido de granulação (costa fibrino-leucocitária, proliferação angio –fibroblástica e reepitelização das bordas da ferida cirúrgica), bem como nas reações de corpo estranho e formação de microabscessos.

No grupo endotoxemia pós-cirúrgica o sub-grupo LPS apresentou piores resultados (menores escores) que o sub-grupo SF quanto à formação de tecido de granulação (crosta fibrino-leucocitária - $p=0,0268$ e reepitelização das bordas da ferida cirúrgica - $p=0,0013$). Não houve diferença significativa quanto à proliferação angio-fibroblástica, reação de corpo estranho e formação de microabscessos.

No grupo endotoxemia pré e pós cirúrgica o sub-grupo LPS demonstrou piores resultados (menores escores) que o sub-grupo SF no que se refere à formação de tecido de granulação (crosta fibrino-leucocitária - $p=0,0268$), proliferação angio-fibroblástica - $p=0,0000$, reepitelização das bordas da ferida cirúrgica $p=0,0000$) e reação de corpo estranho ($p=0,0027$). Não houve diferença significativa quanto à formação de microabcessos.

TABELA 3 - ESCORES OBTIDOS NA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA PELA HEMATOXILINA E EOSINA DO GRUPO ENDOTOXEMIA PRÉ-CIRÚRGICA:

Ratos	Tecido de Granulação						Reação de corpo estranho		Microabcesso	
	Crosta Fibrino-leucocitária		Proliferação angio-fibroblástica		Reepitelização das bordas					
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS
1	2	2	2	2	2	2	1	2	0	1
2	2	2	1	1	2	2	1	2	0	1
3	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1
4	2	2	1	1	2	2	1	1	1	0
5	2	2	1	1	2	2	1	1	2	0
6	2	2	2	1	2	2	2	1	1	0
7	2	2	2	1	2	2	2	1	1	1
8	2	2	2	1	2	2	2	1	0	2
9	2	2	1	2	2	2	1	2	0	2
10	2	2	1	2	2	2	1	2	1	1
Média	2	2	1,4	1,3	2	2	1,3	1,4	0,7	0,9
Desvio-padrão	0	0	0,52	0,48	0	0	0,48	0,52	0,67	0,74
p	---		0,6264		---		0,9658		0,4925	

LEGENDA: SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS – LIPOPOLISSACARÍDEO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

TABELA 4 - ESCORES OBTIDOS NA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA PELA HEMATOXILINA E EOSINA DO GRUPO ENDOTOXEMIA PÓS-CIRÚRGICA:

Ratos	Tecido de Granulação						Reação de corpo estranho		Microabcesso	
	Crosta Fibrino-leucocitária		Proliferação angio-fibroblástica		Reepitelização das bordas					
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS
1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1
2	2	1	2	0	2	1	2	2	1	1
3	2	1	1	1	2	1	1	1	2	1
4	2	1	1	0	2	1	1	0	0	1
5	2	2	1	1	2	1	2	1	2	1
6	2	1	2	0	2	2	2	1	1	0
7	2	2	1	1	2	0	2	1	1	1
8	2	2	2	1	2	2	1	1	1	0
9	2	2	1	2	2	1	1	2	1	2
10	2	2	1	1	2	2	1	2	0	1
Média	2	1,6	1,4	0,9	2	1,2	1,5	1,3	1	0,9
Desvio-padrão	0	0,52	0,52	0,74	0	0,63	0,53	0,67	0,67	0,57
p	0,0268		0,0899		0,0013		0,4903		0,7758	

LEGENDA: SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS – LIPOPOLISSACARÍDEO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

TABELA 5 - ESCORES OBTIDOS NA AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA PELA HEMATOXILINA E EOSINA DO GRUPO ENDOTOXEMIA PRÉ E PÓS-CIRÚRGICA:

Ratos	Tecido de Granulação						Reação de corpo estranho		Microabcesso	
	Crosta Fibrino-leucocitária		Proliferação angio-fibroblástica		Reepitelização das bordas					
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS
1	2	2	1	1	2	0	2	1	1	1
2	2	1	2	0	2	0	2	1	1	1
3	2	1	2	0	2	0	2	1	1	1
4	2	1	2	0	2	1	1	0	1	1
5	2	2	2	0	2	1	2	1	2	1
6	2	1	2	0	2	1	2	0	1	1
7	2	2	1	1	2	0	2	1	1	1
8	2	2	2	0	2	2	1	1	1	1
9	2	2	1	1	2	1	2	0	1	2
10	2	2	2	1	2	1	1	2	0	1
Média	2	1,6	1,7	0,4	2	0,7	1,7	0,8	1	1,1
Desvio-padrão	0	0,52	0,48	0,52	0	0,67	0,48	0,63	0,47	0,32
p	0,0268		0,0000		0,0000		0,0027		0,5177	

LEGENDA: SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS – LIPOPOLISSACARÍDEO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

O resumo dos resultados encontra-se no quadro abaixo:

QUADRO 2 - COMPORTAMENTO DAS VARIÁVEIS NOS GRUPOS ENDOTOXEMIA PRÉ, PÓS E PRÉ-PÓS COLOTOMIA EM RELAÇÃO AO GRUPO CONTROLE

Variáveis		ENDOTOXEMIA PRÉ COLOTOMIA		ENDOTOXEMIA PÓS COLOTOMIA		ENDOTOXEMIA PRÉ-PÓS COLOTOMIA	
		SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS
Evolução do modelo	Peso em T7	=	↓	=	=	=	↓
	Peso em T14	=	↓	=	↓	=	↓
Endotoxemia	Variáveis hematológicas	Leucócitos	=	=	↑	=	↑
		Plaquetas	=	=	↓	=	↓
		Bastonetes	=	=	↑	=	↑
	Função Hepática	Bilirrubinas	=	=	↑	=	↑
		TGO	=	=	↑	=	↑
		TGP	=	=	↑	=	↑
		TAP	=	=	↑	=	↑
	Função Renal	Uréia	=	↑	↑	=	↑
		Creatinina	=	↑	↑	=	↑
	Estado Inflamatório	Endotoxina	=	↑	↑	=	↑
		TNF α	=	↑	↑	=	↑
	Cicatrização intestinal	Hidroxirolina	=	=	↓	=	↓
		Colágeno maduro	=	↓	↓	=	↓
		Colágeno imaturo	=	↓	↓	=	↓
		PCNA	=	↓	↓	=	↓
		Tecido de granulação	=	=	↓	=	↓

LEGENDA: SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS – LIPOPOLISSACARÍDEO, ↑ AUMENTO, ↓ REDUÇÃO, = SEMELHANÇA

5 DISCUSSÃO

5.1 O MODELO ANIMAL DE ENDOTOXEMIA

Baseando-se em estudos prévios, desenvolvidos na linha de pesquisa em infecção, do departamento de pós-graduação em Clínica Cirúrgica da UFPR por STAHLKE (2001), BERNHARDT (2008) e TRUBIAN (2008) e MACRI (2008) empregou-se nesse estudo o rato Wistar como animal de experimentação, por ser um animal acessível em quantidade e qualidade em nosso meio e apresentar facilidade para uniformização da amostra. Optou-se pela utilização de LPS como agente desencadeante da endotoxemia por ser possível sua obtenção comercial de forma purificada e oferecer vantagens, frente a outras formas de indução, como a precisão das doses e reprodutibilidade.

A administração endovenosa de LPS (endotoxemia) é amplamente utilizada, por mimetizar os efeitos inflamatórios observados em pacientes com sepse e choque séptico, como a liberação de grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias circulantes, promover alterações hematológicas e de funções vitais como a hepática e a renal (MORRISON, 2001; FINK e HEARD, 1990; VANASCO *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2009; OLESEN *et al.*, 2009; ALVAREZ *et al.*, 2009). Apresenta como desvantagem a diferença de que a endotoxemia em seres humanos é causada por um foco infeccioso mantido ou por trauma e não pela inoculação direta da endotoxina.

No presente estudo, visando a sobrevivência dos ratos por um período de sete dias para possibilitar a avaliação da cicatrização colônica ao sétimo dia de pós-operatório, é que escolheu-se a administração diária de LPS por via endovenosa na dose de 1mg/kg. Foram avaliadas três diferentes situações experimentais, baseadas em ocorrências da prática hospitalar: endotoxemia pré-cirúrgica, endotoxemia pós-cirúrgica e a endotoxemia pré e pós-cirúrgica.

Na endotoxemia pré-cirúrgica o LPS foi inoculado durante sete dias prévios à operação e no sétimo dia os ratos foram submetidos à colotomia em vigência de estado endotóxico. No pós-operatório de sete dias, o estímulo endotóxico foi interrompido e os ratos deste grupo receberam solução fisiológica por via endovenosa diariamente até o sétimo dia pós-operatório.

Na endotoxemia pós-cirúrgica o LPS foi inoculado durante sete dias após a colotomia, induzindo no período pós-operatório o estímulo endotóxico diário por via endovenosa, para que a endotoxemia tivesse início na data da colotomia e fosse mantida até o sétimo dia.

Na endotoxemia pré e pós-cirúrgica o LPS foi inoculado durante sete dias que antecederam a colotomia e nos sete dias de pós-operatório, induzindo estímulo endotóxico

diário por via endovenosa, para que a endotoxemia tivesse início sete dias prévios à colotomia e fosse mantida durante este período até o sétimo dia pós-operatório.

A dose de escolha do LPS foi de 1mg/kg, após as avaliações do estudo piloto do presente trabalho, amparados por descrições anteriores (MORRISON, 2001; FINK e HEARD, 1990; TRUBIAN, 2008 e BERNHARDT 2008) e reconhecendo o fato de que a dose letal em ratos é de 20 a 80mg/kg (ALEXANDER *et al.*, 1990). As doses de LPS variam conforme o propósito dos estudos experimentais, sendo utilizadas doses altas para a indução de endotoxemia em ratos em estudos de curtas durações, no máximo 24 a 48 horas de duração, 10mg/kg por via intraperitoneal (VANASCO *et al.*, 2008; YANG *et al.*, 2009; OLESEN *et al.*, 2009) e 4mg/kg por via intraperitoneal (ALVAREZ *et al.*, 2009).

Dados ainda não publicados referentes à fase inicial desse estudo padronizaram a metodologia de indução de endotoxemia em ratos e sua manutenção por até quatorze dias. Concluíram que administração de endotoxina na dose de 1mg/kg, por via endovenosa diariamente causava endotoxemia, liberação de fator de necrose tumoral alfa, alterações hematológicas e das funções renal e hepática, alterações estas compatíveis com a endotoxemia humana e não houve mortalidade dos animais, embora ao término do estudo apresentavam-se com intensa caquexia e estado geral muito comprometido (REPKA *et al.*, 2009).

Para a preparação da solução de LPS devem ser considerados alguns cuidados especiais de Biossegurança para evitar a sua inalação por parte do preparador, contar com balança analítica de precisão e na solubilização em solução fisiológica evitar aerossóis e contato com a pele e mucosas. Após a preparação a solução pode ser mantida por tempo ilimitado sob congelamento a -20°C, pois é estável a esta temperatura. Sugere-se também que seja preparado todo o volume da solução a ser utilizada no experimento em uma única etapa de trabalho ou, como posto em prática no presente estudo, prepará-la imediatamente antes do uso.

Esmon em 2000, ao questionar porque algumas vezes os modelos animais falham ao mimetizar a sepse humana, concluiu que esses estudos falhavam nas suas concepções básicas e apontou como exemplos os estudos em animais demasiadamente jovens (recém desmamados), enquanto que na população humana a sepse tem maior prevalência em idosos e portadores de comorbidades como o diabetes, doenças vasculares sistêmicas, hipertensos, imunodeprimidos e portadores de câncer. Mencionou também a forma de indução da sepse, que ao contrário do desafio¹ executado em alguns estudos animais, nos seres humanos ela ocorre com maior frequência por mais de uma bactéria e esta é presente

¹ Termo empregado para designar a inoculação em uma única dose, sinônimo de “bolus”.

em um foco infeccioso persistente, com liberação contínua de LPS para a circulação sistêmica, fato este focado nos grupos do presente estudo.

No transcurso desse estudo não ocorreram mortes dos ratos e foi verificada progressiva perda de peso dos que receberam inoculações com LPS em comparação com os que receberam solução fisiológica.

Conforme demonstrado na tabela 2 e nos gráficos 1, 2 e 3, os ratos dos sub-grupos SF apresentaram ganho de peso e não diferiram significativamente do grupo C em T0 ($p=0,9873$), T7 ($p=0,5909$) e em T14 ($p=0,9523$), o que comprova que a via de inoculação utilizada e a colotomia não se comportaram como variáveis e valida o controle no presente estudo.

No grupo endotoxemia pré-cirúrgica, no sétimo dia, ambos os sub-grupos foram submetidos à colotomia e o subgrupo SF apresentou média de peso superior ao subgrupo LPS ($p<0,0001$) e no período pós-cirúrgico, no décimo quarto dia o subgrupo SF mantinha a média de peso significativamente maior ($p<0,0001$) que a média do subgrupo LPS, no qual durante este período a inoculação de LPS foi substituída por SF. Esses resultados podem ser comparados aos de Garrido *et al.*, (2006), que embora estudaram os efeitos de uma única dose de 1mg/kg de LPS em ratos, observaram em um período curto de avaliação, perda de peso significativa quando compararam ao grupo controle inoculado com SF e justificaram a perda de peso pelos efeitos do LPS ao induzir hipofagia e diminuição da locomoção, sintomas coletivamente relacionados com a prostração, que também ocorreram nos ratos inoculados com LPS nesse estudo.

Observou-se ainda no presente estudo que os ratos do subgrupo endotoxemia pré e pós-cirúrgica chegaram ao sétimo dia de evolução pós-operatória em estado geral comprometido. As principais manifestações observadas foram prostração, piloereção e blefarite sanguinolenta. Os do subgrupo endotoxemia pós-cirúrgica apresentaram-se menos graves que os do subgrupo endotoxemia pré-cirúrgica e sem alterações clínicas.

Cabe ressaltar que em 1948, João Xavier Viana na Universidade Federal do Paraná, foi de forma pioneira no Brasil, o primeiro pesquisador a estudar a sepse experimental, utilizou coelhos para avaliação da ativação plaquetária. O autor preparou extratos de *Neisseria intracelularis*, *Salmonella typhi* e *Escherichia coli*, e recebendo a colaboração de eminentes pesquisadores da época como Dr^a Jandira Planet do Amaral, Dr. Otto Bier e Dr. Mauricio Rocha e Silva concluiu que efetivamente os extratos bacterianos promoviam a diminuição e agregação das plaquetas circulantes. O estudo valeu ao autor a titulação de professor catedrático nessa universidade.

As alterações metabólicas que ocorrem durante a sepse são evocadas pelos mediadores imunológicos e paradoxalmente, as respostas metabólicas, por sua vez, afetam as suas próprias funções imunológicas. Tentativas de manipular o sistema imunológico

durante sepse têm demonstrado a ocorrência de graves consequências metabólicas, bem como o inverso é igualmente verdade. São descritas alterações no metabolismo de carboidratos verificadas pelo aumento na taxa de produção da glicose, com níveis elevados de glicemia. Os níveis circulantes de insulina podem estar diminuídos, normais, ou mais comumente elevados. Na sepse grave com secundária falência orgânica associada à hipoglicemia, as baixas taxas de produção de glicose são justificadas pela disfunção hepática, redução do fluxo sanguíneo esplâncnico ou pela combinação dessas situações. Com o início da sepse grave e falência múltipla de órgãos, há aumento da glicólise aeróbica e os níveis séricos de lactato elevam-se, mesmo na ausência de hipoxia (CONSENSO BRASILEIRO DE SPSE, 2003).

No presente estudo, contrapondo-se a outros, optou-se pelo termo endotoxemia em lugar de sepse, pela impossibilidade de avaliar alterações hemodinâmicas e do nível de consciência, bem como a hipotensão arterial durante todo o período de 14 dias, que segundo os critérios do Consenso Brasileiro de Sepse (2003), são variáveis indispensáveis para a caracterização de um quadro séptico.

Apesar das limitações, modelos animais permanecem essenciais para o desenvolvimento de todas as novas terapias para a sepse e choque séptico, pois fornecem dados fundamentais quanto a diversos parâmetros como a farmacocinética, toxicidade e mecanismos de ação das drogas e que não podem ser de outro modo reproduzidos (GARRIDO, FIGUEIREDO e SILVA, 2004).

5.2 AVALIAÇÃO DO ESTADO ENDOTÓXICO

Entre as avaliações recomendadas pelo Consenso Brasileiro de Sepse de 2003, devem ser procedidas avaliações hematológicas, das funções hepática e renal, da presença de LPS circulante e do estado inflamatório. Na presente avaliação do estado endotóxico foram executadas em uma única oportunidade, no sétimo dia de evolução pós-operatória, por não ser possível a coleta de sangue por punção cardíaca em oportunidades anteriores, como no momento da colotomia, pois os ratos dos sub-grupos endotoxemia pré e pré-pós-cirurgia apresentavam perda significativa de peso e a coleta de sangue por essa via de punção poderia contribuir para mortalidade desses ratos.

Quanto às avaliações hematológicas, foi observado aumento da contagem total de leucócitos, aumento da contagem de bastonetes, diminuição das plaquetas nos ratos dos grupos que receberam LPS no período pré-operatório e de forma mais intensa nos ratos que receberam no pós e no pré-pós-operatório.

Os ratos dos sub-grupos controles não demonstraram diferenças significantes o que demonstra a homogeneidade da amostra e os efeitos da inoculação do LPS nos grupos

que o receberam. Dessa forma, as avaliações hematológicas corroboraram as recomendações Consenso Brasileiro de Sepse de 2003, sendo verificados achados similares aos observados na prática médica em casos de endotoxemia e sepse. Ressalta-se que a metodologia utilizada para as avaliações hematológicas no presente foram as mesmas empregadas por outros pesquisadores (FADEL, 2008, BENHARDT, 2008; MACRI 2008).

Foi avaliada também a quantidade de LPS circulante nos ratos. Empregou-se o método do LAL, o qual tem sido alvo de críticas na literatura devido a sua sensibilidade, conforme descrito por HURLEY em 1970. IKEMURA *et al.*, em 1989 criticam o método do LAL por propiciar a falsa-positividade quando a amostra a ser analisada é sangue total, devido a presença de plaquetas que podem induzir a gelificação do reativo da mesma forma que o LPS a ser investigado. Para eliminar esta variável optou-se neste estudo pela avaliação do nível plasmático e não em sangue total. Outras metodologias estão disponíveis na literatura como a utilização de métodos com radioisótopos e nefelométricos, as quais não estão ainda padronizadas no nosso meio (KOLLEF *et al.*, 1996).

A administração de LPS induz a superprodução de TNF- α em poucas horas em ratos (BLACKWELL e CHRISTMAN, 1996; SILVA *et al.*, 2007). No presente estudo, metodologia empregada do LAL permitiu diferenciar no soro dos ratos a ausência, níveis baixos, intermediários e elevados de LPS. De fato, esta metodologia requer uma implementação laboratorial elevada e também acurada experiência para a sua execução, uma vez que contaminantes pirogênicos e enzimáticos podem interferir nos resultados. Para que esta variável não interferisse nos resultados, optou-se pela utilização de materiais esterilizados e apirogênicos.

As dosagens de LPS mais elevadas ocorreram nos grupos inoculados nos períodos pós e pré-pós cirúrgicos. Os sub-grupos controles não demonstraram níveis detectáveis de LPS, pois conforme a demonstração no gráfico 13, nos sub-grupos controles, não houve detecção de LPS. Entre os sub-grupos sob indução de endotoxemia observaram-se os valores de $0,0078 \pm 0,02$ UE/ml no grupo endotoxemia pré-cirúrgica, $0,0741 \pm 0,06$ UE/ml no grupo endotoxemia pós-cirúrgica e $0,1092 \pm 0,06$ UE/ml no grupo endotoxemia pré e pós-cirúrgica.

Conforme COIMBRA, MELBOSTAD, HOYT (2004) e STAHLKE (2001) o estímulo mais importante para despertar a produção do TNF- α pelos macrófagos é o LPS, como acontece nas infecções por bactérias Gram-negativas, onde podem ser produzidas grandes quantidades de TNF β , corroborando com os achados laboratoriais deste estudo.

Quanto à dosagem de TNF α , o método ora empregado foi o imunoenzimático que provê elevada sensibilidade e é amplamente utilizado. No presente estudo, conforme

demonstração no gráfico 14, nos sub-grupos SF, não houve diferença significativa em relação ao grupo controle. Entre os sub-grupos LPS observaram-se os valores maiores no grupo pré e pós-cirúrgica que nos demais sub-grupos, o que é coerente uma vez que este sub-grupo recebeu estímulo inflamatório por tempo mais prolongado que os demais.

As avaliações das funções hepática e renal foi possível caracterizar significantes alterações destas funções, destacando-se as dosagens de bilirubinas totais, das aminotransferases (TGO e TGP) e alargamento do TAP em comparação aos demais grupos que receberam LPS. A disfunção hepatocelular pela infusão do LPS demonstrada neste estudo foi também observada por Macarthur *et.al.*, em 2000.

Quanto às avaliações da função renal, através das dosagens de uréia e creatinina demonstradas nos gráficos 11 e 12, observou-se a mesma tendência das alterações hepáticas, pois os maiores valores foram detectados no sub-grupo LPS pré e pós-cirúrgica que nos demais sub-grupos. A insuficiência renal aguda é uma complicação freqüente em pacientes sépticos, associada com uma alta taxa de mortalidade. Uma característica importante é o decréscimo na taxa de filtração glomerular, presentes em situações onde o fluxo sanguíneo precisa ser mantido. Prevalecendo a hipótese na qual a patogênese da insuficiência renal sugere uma liberação não controlada e inapropriada de vários mediadores inflamatórios. (OLIVEIRA, 2001). Foram demonstrados níveis elevados de uréia e creatinina em ratos induzidos com o modelo de endotoxemia por ligadura e perfuração cecal, modelo cuja aplicabilidade no estudo de disfunções orgânicas é pouco utilizado devido à sobreposição de fenômenos inflamatórios e infecciosos, não permitindo sobrevida maior que 24 a 48 horas dos animais (VANASCO *et al.*, 2008). Macri em 2008 avaliou a função renal de ratos em vigência de sepse induzida por inoculação de LPS e submetidos a pneumoperitônio por dióxido de carbono e detectou níveis elevados de uréia, creatinina e $TNF\alpha$. Concluiu que 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.

Assim sendo, o estado endotóxico dos ratos inoculados com LPS pode ser evidenciado, seguindo as mesmas aferições utilizadas na prática médica diária. Evidenciaram-se leucocitose, desvio nuclear à esquerda, plaquetopenia, deficiências coagulativas, níveis elevados de $TNF\alpha$, disfunções hepáticas e renais.

5.3 AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO INTESTINAL

Não apenas a taxa absoluta do colágeno, mas também a forma de disposição de suas fibras, as quais são rearranjadas no transcurso do tempo, são responsáveis pela resistência tecidual. Assim, o estudo da quantidade de colágeno, representado pela taxa de

hidroxiprolina tecidual, permite uma análise valiosa, porém parcial, de uma cicatriz. A síntese de colágeno é estimulada por TGF- β , PGDF e EGF, e representa mais de 25% do total de proteína corpórea e mais de 50% da proteína no tecido da cicatriz. Até o presente já foram identificados 14 tipos diferentes de colágeno em mamíferos. Destes, quatro, numerados de I a IV, são os mais conhecidos. Eles diferem entre si pela composição química, pelo modo de associação entre suas moléculas, pelas funções que desempenham e pelas doenças que a sua má-formação e a sua produção excessiva ou insuficiente podem causar. Em tecidos intactos, o colágeno tipo I predomina e constitui 80 a 90% e os restantes 10 a 20% são do tipo III (GIAQUINTO e MOTA, 2005).

No trato gastrointestinal a camada submucosa contém a maior quantidade de colágeno em relação às outras camadas e difere da pele, sendo 68% do tipo I, 20% do tipo III e 12% do tipo V, encontrado em vasos sanguíneos (KIVIRIKKO e RISTELLI, 1976).

O tipo I consiste em uma tripla hélice, envolvendo três cadeias polipeptídicas que são sintetizadas separadamente no citoplasma dos fibroblastos. As cadeias polipeptídicas consistem em um padrão repetido de glicina-X-Y, no qual a posição X é ocupada pela prolina e a Y, pela hidroxiprolina. A interação de cadeias inicia a formação da hélice tríplice que é secretada como pró-colágeno no meio extracelular (KIVIRIKKO e RISTELLI, 1976). Dentro da célula, o colágeno passa por oito etapas, antes de ser secretado para o meio extracelular, como pró-colágeno. A etapa crítica envolve a hidroxilação da prolina e da lisina nas cadeias polipeptídicas, que requer enzimas específicas e co-fatores, como oxigênio, vitamina C, íon ferro e alfa-cetoglutarato. A hidroxiprolina se constitui em um importante marcador da quantidade de colágeno nos tecidos, já que é exclusivamente encontrada no colágeno. A hidroxilisina é elemento essencial para a formação de ligações, tanto dentro das moléculas de colágeno quanto entre elas (MONACO e LARENCE, 2003).

A quantificação da hidroxiprolina como avaliação do colágeno das anastomoses foi utilizada por diversos pesquisadores (MILLER e GAY, 1982; ISHIMURA, 2002; CIHAN, 2004). Entretanto, vale ressaltar que os vários tipos de colágeno apresentam quantidades distintas de hidroxiprolina; dessa forma, a dosagem de hidroxiprolina é um método indireto de avaliar a deposição de fibras de colágeno, gerado durante o processo de cicatrização da anastomose (BEZUTI *et al.*, 2002). Mais recentemente, tem sido dada ênfase ao uso de métodos qualitativos de avaliação de colágeno (HENDRICKS e MASTBOOM, 1990). A coloração de picrosirius com microscopia polarizada diferencia as fibras colágenas de acordo com a sua birrefringência; as fibras de maior espessura (colágeno do tipo I) aparecem fortemente birrefringentes e fibras de menor espessura (colágeno tipo III) aparecem fracamente birrefringentes. Esta diferenciação de cores permite análise qualitativa das fibras colágenas, obtendo-se a densitometria de fibras maduras (colágeno tipo I) e

imaturas (colágeno tipo III) que, em última análise, reflete a proporção de entrelaçamento das fibras (JUNQUEIRA, MONTES e SANCHES, 1982).

Conforme demonstrado no gráfico 16, através da metodologia de histometria computadorizada para quantificação porcentual de colágenos, pode-se observar a diminuição significativa na porcentagem de colágeno maduro (tipo I) nos sub-grupos inoculados com LPS.

Ishimura *et al.*, (1998) avaliaram a integridade anastomótica de ferida cicatricial colônica sob condições sépticas. Utilizaram ratos *Sprague-Dawley* e camundongos ICR, inoculados com LPS de *Escherichia coli* 0127: B8, 24 horas após a cirurgia. Avaliaram a pressão de ruptura da anastomose, a dosagem de hidroxiprolina tecidual e a histopatologia pelos métodos de hematoxilina-eosina e imunoistoquímica para a pesquisa de IL-6. Após sete dias de evolução a sobrevivência dos animais inoculados com LPS (60%) foi significativamente menor que do grupo controle (93,3%) com $p < 0,05$. A concentração tecidual de hidroxiprolina nos segmentos anastomóticos, após sete dias de evolução após a cirurgia foram de $14,26 \pm 0,47$ nmol/mg de tecido no grupo controle e $12,75 \pm 0,10$ nmol/mg de tecido no grupo inoculado com LPS com $p < 0,01$. No presente estudo foi demonstrado no gráfico 15, que nos sub-grupos do grupo endotoxemia pré-cirúrgica não houve diferença significativa nas dosagens teciduais de hidroxiprolina ($p = 0,7224$). No grupo endotoxemia pós-cirúrgica, o subgrupo LPS apresentou média das dosagens teciduais de hidroxiprolina significativamente menores que o subgrupo SF ($p = 0,0016$) e no grupo endotoxemia pré e pós o sub-grupo LPS demonstrou dosagem média tecidual de hidroxiprolina significativamente menor ($p = 0,0002$) que a média do subgrupo SF. Apesar da diferença metodológica, esses resultados apresentam a mesma tendência dos resultados obtidos no presente estudo, conforme demonstrado no gráfico 15, no grupo endotoxemia pós-cirúrgica, o subgrupo LPS apresentou média das dosagens teciduais de hidroxiprolina significativamente menores que o subgrupo SF ($p = 0,0016$) e no grupo endotoxemia pré e pós o sub-grupo LPS também observaram-se dosagens médias teciduais de hidroxiprolina significativamente menores ($p = 0,0002$) que a média do subgrupo SF.

A supressão da atividade enzimática propicia a síntese de colágeno sub-hidroxilado, que é incapaz de gerar ligações fortes e contração da ferida. As citocinas inflamatórias desempenham papel fundamental na supressão enzimática. Na formação de colágeno, a tríplice hélice é secretada como protocolágeno no espaço extracelular e enzimas pró-colágeno-C-proteinases e pró-colágeno-N-proteinases clivam o extremo pró-peptídico de suas moléculas. Desta forma diminui a solubilidade das moléculas, iniciando o processo de formação de fibrilas. Durante este processo, moléculas de colágeno são inicialmente unidas por laços eletrostáticos, posteriormente, grupos livres de amina em resíduos de lisina hidroxiprolina, dentro da molécula de colágeno são transformados em

resíduos-aldeído pela enzima lisil-oxidase (KIYAMA *et al.*, 2000). Os resíduos-aldeído interatuam com lisina ou resíduos de hidroxilisina de outras moléculas, resultando na formação de ligações covalentes estáveis entre as moléculas. As ligações estabilizam a união das moléculas de colágenos em fibrilas e fibras que fornecem as características especiais de resistência do colágeno. A agressão endotóxica leva à liberação de mediadores inflamatórios que ativam respostas hormonais anormais, lideradas pelo aumento acentuado de catecolaminas e outros hormônios que produzem um estado hipermetabólico-catabólico. Todo um espectro de anomalias pode ser observado durante a inflamação sistêmica devido a diferentes níveis em relação às manifestações do organismo (ZHANG *et al.*, 2002).

Se não controlada, a resposta a esta agressão pode progredir com perda de proteína corporal e qualidade da cicatrização de uma ferida (FERRANDO e WOLFE, 2007). Controlar o nível de prejuízo em curso exige o controle da resposta do inflamatória do hospedeiro e ao mesmo tempo compensar as suas necessidades metabólicas para evitar maior deterioração do estado geral. Na inflamação sistêmica o catabolismo supera anabolismo e os hormônios catabólicos, hormônios anabólicos, o hormônio do crescimento, a testosterona estão diminuídos induzindo rapidamente esgotamento massivo das reservas de proteínas (POMPEO, 2007; MACARTHUR *et al.*, 2000).

A desnutrição protéica e energética em ratos submetidos à endotoxemia pelo LPS provocou piora na cicatrização da anastomose colônica, redução da resistência mecânica avaliada pelo estudo tensiométrico de ratos, redução na relação colágeno maduro e imaturo, no quinto dia pós-operatório, proliferação de miofibroblastos e aumento de vasos sanguíneos nas anastomoses dos animais desnutridos submetidos à endotoxemia pelo LPS (BERNHARDT, 2008).

No presente estudo foi verificado que os animais inoculados com LPS, dos três grupos avaliados cursaram os períodos com perda significativa de peso. A perda de peso nestas condições podem ser indicadores de ocorrência de aumento no metabolismo, apesar de que a ingesta diária dos ratos não foi avaliada. Conforme demonstrado no quadro 2, fatos importantes ocorreram simultaneamente no subgrupo LPS, que recebeu inoculações de endotoxina nos períodos pré e pós-operatórios. Verificou-se no presente estudo que a perda de peso pode ser associada com a gravidade do quadro endotóxico demonstrado pelas significantes alterações hematológicas, deterioração das funções renais e hepática, pelos elevados níveis circulantes de endotoxinas e de $TNF\alpha$, pela diminuição da hidroxiprolina tecidual, pela menor porcentagem de colágeno maduro e também pela diminuição da proliferação angio-fibroblástica. Na avaliação histopatológica das anastomoses após a coloração pela hematoxilina e eosina, conforme as tabelas 3, 4 e 5, procedeu-se a análise da crosta fibrinoleucocitária, contendo fibrina e células sanguíneas na superfície da ferida e

observou-se nos grupos sepse resultados similares entre os escores dos sub-grupos controle e endotoxemia, em média próximos a dois relativos à avaliação moderada.

Quanto à proliferação angiofibroblástica, verificando-se a formação do tecido de granulação, a neovascularização (angiogênese) e a proliferação de fibroblastos, observou-se similaridade entre os sub-grupos controles e diminuição do tecido de granulação entre os subgrupos endotoxemia dos grupos pós-cirúrgica e pé e pós-cirúrgica quando comparados aos respectivos sub-grupos controles (OLSON, HELLYER e DODAM, 1995).

O mesmo comportamento foi observado quando se analisou a reepitelização das bordas dedicando-se especial atenção ao avanço do epitélio em torno da ferida.

Na avaliação da reação a corpo estranho, investigou-se a formação de agregado granulomatoso, com células gigantes ao redor do fio de sutura e também a presença de macrófagos e foram observadas similaridades entre os sub-grupos-controles e no sub-grupo endotoxemia do grupo pré-cirúrgica. Nos sub-grupos endotoxemia dos grupos pós e pré-pós cirúrgica foram observadas diminuições nesta reação quando comparados aos respectivos sub-grupos controles.

Na observação da formação de microabscessos, a qual permitiu a investigação de possível ocorrência de necrose tecidual, mediante visualização de neutrófilos e de macrófagos, não houve diferenças entre os sub-grupos avaliados.

A deiscência de uma anastomose intestinal ainda constitui um dos maiores problemas nas intervenções cirúrgicas gastrintestinais e diversos trabalhos foram desenvolvidos com enfoque nos fatores que interferem com o processo de cicatrização dessas anastomoses. Contudo, efetivamente, o mecanismo pelo qual as citocinas pró-inflamatórias, secundárias ao estímulo endotóxico, interferem no processo cicatricial, ainda paira em terreno especulativo. Através do presente estudo pode-se inferir que se trata de uma associação multifatorial associando níveis séricos elevados de TNF com 1) alterações metabólicas levando a um estado consumptivo, verificada pela intensa perda ponderal; 2) diminuição da viabilidade celular na área anastomótica intestinal; comprovada pela diminuição do antígeno nuclear de proliferação celular; 3) diminuição da síntese de colágeno, verificada pela menor disponibilidade de hidroxiprolina e colágeno maduro na área anastomótica, sem contudo, ser possível propor uma ordem sequencial entre esses eventos.

Como perspectivas futuras para a abordagem do presente estudo, podem ser projetadas avaliações enfocando outros parâmetros como o estresse oxidativo, as alterações morfológicas vasculares e intestinais em animais não submetidos à intervenção cirúrgica, o bloqueio das enzimas óxido nítrico-sintetase, a suplementação nutricional com arginina e L-NAME, o uso de anticorpos monoclonais anti TNF α , as alterações miocárdicas entre outros.

6 CONCLUSÕES

A endotoxemia induzida nas diferentes fases desse estudo ocasionou:

Na fase pré-cirúrgica: perda ponderal, aumento dos níveis séricos de endotoxina e de $\text{TNF}\alpha$, alteração da função renal, piora do padrão cicatricial caracterizada pela diminuição da viabilidade celular, da quantidade de colágeno maduro e aumento do colágeno imaturo.

Nas fases pós-cirúrgica e pré/pós cirúrgicas: perda ponderal, aumento dos níveis séricos de endotoxina e $\text{TNF}\alpha$, alterações hematológicas e das funções hepática e renal, piora do padrão cicatricial caracterizada pelas diminuições da quantidade de hidroxiprolina tecidual, da viabilidade celular, do tecido de granulação e do colágeno maduro e aumento do colágeno imaturo.

Referências

- ABBAS A.K.; LICHTMAN, A.H. Citocinas (capítulo 11), Imunidade Inata (capítulo 12). In: _____ **Imunologia Celular e Molecular**. 5ª edição. Rio de Janeiro, Elsevier, 2004. p. 267-301.
- AKAMINE, N.; SILVA, E.; FERNANDES JÚNIOR, C.J.; KNOBEL, E. Fisiopatologia do choque e da disfunção de múltiplos órgãos. In: KNOBEL E. **Condutas no paciente grave** (volume1). São Paulo: Atheneu, terceira edição, 2007. p. 41-78.
- AKIRA, S.; TAKEDA, K. Toll-like receptor signaling. **Nat Rev Immunol**, London, v. 4, n.7, p. 499-511, 2004.
- ALEXANDER, J.W.; BOYCE, S.T.; BABCOCK, G.F.; GIANOTTI, L.; PECK, M.D.; DUNN, D.L.; PYLES, T.; CHILDRESS, C.P.; ASH, S.K. The process of microbial translocation. **Ann Surg**, Philadelphia, v. 212, n.4, p. 496-512, 1990.
- ALVAREZ, R.G.; ZAMORA, Z.B.; BORREGO, A.; DELGADO, R.; SCHULZ, S.; ALONSO, Y. Ozone oxidative preconditioning reduces nitrite levels in blood serum in LPS: induced endotoxic shock in mice. **Inflamm Res**, Basel, v. 58, n. 8, p. 441-443, 2009.
- 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, n. 7, p. 1303-1310, 2001.
- BAGBY, G.J.; PLESSALA, K.J.; WILSON, L.A.; THOMPSON, J.J.; NELSON, S. Divergent efficacy of antibody to tumor necrosis factor alpha in intravascular and peritonitis models of sepsis. **J Infect Dis**, Chicago, v. 163, n. 1, p. 83-88, 1991.
- BEM-SHAUL, V. ; SOFER, Y.; BERGMAN, M.; ZUROVSKY, Y.; GROSSMAN, S. Lipopolysaccharide induced oxidative stress in the liver: comparison between rat and rabbit. **Shock**, Augusta, v. 12, n. 4, p. 288-293, 1999.
- BERNHARDT, J.A. **Influência da desnutrição na cicatrização da anastomose colônica em ratos toxêmicos**. 100 f. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- BERTÓK, L. Role of endotoxins and bile acids in the pathogenesis of septic circulatory shock. **Acta Chir Hung**, Budapest, v. 36, n. 1-4, p. 33-36, 1997.
- BEUTLER, B.; CERAMI, A. The common mediator of shock, cachexia, and tumor necrosis. **Adv Immunol**, New York, n. 42, p. 213-231, 1988.
- BEUTLER, B.; KROCHIN, N.; MILSARK, I.W.; LUEDKE, C.; CERAMI, A. Control of cachectin (Tumor Necrosis Factor) synthesis: mechanisms of endotoxin resistance. **Science**, Washington, v. 232, n. 4753, p. 977-979, 1986.
- BEZUTI, M. T.; FÉRES, O.; CAMPOS, A. D.; APRILLI, F.; DA ROCHA, J. J. R.; GARCIA, R. S.; JOVILIANO, O. F. D. Cicatrização de anastomoses colônicas na vigência de obstrução intestinal: estudo experimental em ratos. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 17 (supl.3), p. 109-115, 2002.

BIONDO-SIMÕES, M.L.; GRECA, F.G.; BRYK JUNIOR, A.; KOMATSU, M.C.G.; BITTENCOURT, F.O.; GRECA, L.M. Influência da peritonite sobre a síntese de colágeno em anastomoses do cólon distal: estudo experimental em ratos. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 15, n. supl 3, p. 69-73, 2000.

BLACKWELL, T.S.; CHRISTMAN, J.W. Sepsis and cytokines: current status. **Br J Anaesth**, Altrincham, v. 77, n. 1, p. 110-117, 1996.

BONE, R.C.; MAUNDER, R.; SLOTMAN, G.; SILVERMAN, H.; HYERS, T.M.; KERSTEIN, M.D.; URSprung, J.J. An early test of survival in patients with the adult respiratory distress syndrome. The PaO₂/Fio₂ ratio and its differential response to conventional therapy. Prostaglandin E1 Study Group. **Chest**, **Park Ridge**, v. 96, n. 4, p. 849-851, 1989.

BOONTHAM, P.; CHANDRAN, B.; ROWLANDS, O.; EREMIN. Surgical sepsis: dysregulation of immune function and therapeutic implications. **Surg J R Coll Surg**, Edinburgh and Ireland, v. 1, n. 4, p. 187-206, 2003.

BRASKEN, P.; LEHTO, M.; RENVALL, S. Changes in the connective tissue composition of the submucosal layer of colonic anastomosis. An immunohistologic study in rats. **Acta Chir Scand**, Stockholm, v. 155, n. 8, p. 413-419, 1989.

BRAVO, R. Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication. **Exp Cell Res**, New York, v. 163, n. 2, p. 287-293, 1986.

BRAVO, R.; MACDONALD-BRAVO, H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. **J Cell Biol**, New York, v. 105, n. 4, p. 1549-1554, 1987.

CAMPOS, A.C.L.; BORGES-BRANCO, A.; GROTH, A.K. Cicatrização de feridas. **Arq Bras Cir Dig**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 51-58, 2007.

CAMPOS, A.C.L.; MEGUID, M.M.; COELHO, J.C.U. Factors influencing outcome in patients with gastrointestinal fistula. **Surg Clin North Am**, Philadelphia, v. 76, n. 5, p. 1191-1198, 1996.

CARLSON, G.L. Insulin resistance in sepsis. **Br J Surg**, Bristol, v. 90, n. 3, p. 259-260, 2003.

CIHAN, A.; OGUZ, M.; ACUN, Z.; UÇAN, B. H.; ARMUTCU, F.; GÜREL, A. Comparison of Early Postoperative Enteral Nutrients versus Chow on Colonic Anastomotic Healing in Normal Animal. **Eur Surg Res**, Basel, v. 36, p. 112-115, 2004.

COIMBRA, R.; MELBOSTAD, H.; HOYT, D.B. Effects of phosphodiesterase inhibition on the inflammatory response after shock: role of pentoxifylline. **J Trauma**, Baltimore, v. 56, n. 2, p. 442-449, 2004.

CONSENSO BRASILEIRO DE SEPSE. Disponível em:
<http://www.medicinaintensiva.com.br/consenso-sepse.htm> e em
<http://www.smaconsultores.com.br/sepse1/>. Acesso em 10/04/2009.

CONTER, R.L.; ROOF, L.; ROSLYN, J.J. Delayed reconstructive surgery for complex enterocutaneous fistulae. **Am Surg**, Atlanta, v. 54, n. 10, p. 589-593, 1988.

COSTA, M.A.R.; JENKIS, R.L. Complicações cirúrgicas. In: COELHO, J.C.U. **Manual de clínica cirúrgica - cirurgia geral e especialidades**, volume 1. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, primeira edição, 2009. p. 101-121.

COUTINHO, A. Genetic control of B-cell responses. II. Identification of the spleen B-cell defect in C3H/HeJ mice. **Scand J Immunol**, Oslo, v. 5, n. 1-2, p. 129-140, 1976.

DARVILLE, T.; GIROIR, B.; JACOBS, R. The systemic inflammatory response syndrome (SIRS): immunology and potential immunotherapy. **Infection**, Munich, v. 21, n. 5, p. 279-290, 1993.

DECKER, T.; LOHMANN-MATTHES, M.L.; KARCK, U.; PETERS, T.; DECKER, K. 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 Leukoc Biol**, New York, v. 45, n. 2, p. 139-146, 1989.

DEITCH, E.A. Multiple organ failure: pathophysiology and potential future therapy. **Ann Surg**, Philadelphia, v. 216, n. 2, p. 117-134, 1992.

DIETZ, U.A.; CZECHKO, N.G.; LEMOS, R.; ARAÚJO, A.C.F.; INÁCIO, C.M.; SALLES JÚNIOR, G.S.; CORREIA NETO, M.C.; REPKA, J.C.D.; ZANELATO, C.; MALAFAIA, O.; DEBUS, E.S.; THIEDE, A. Terminolateral esophagojejunostomy after gastrectomy with the biofragmentable anastomosis ring in the dog model. **Zentralbl Chir**, Leipzig, v. 130, n. 3, p. 274-279, 2005.

DIETZ, U.A.; TORRES, O.J.M.; INSFRAN, G.M.; NASSIF, P.A.N.; HIRT, A.L.A.; REPKA, J.C.D.; MALAFAIA, O.; CZECHKO, N.G. Estudo da taxa de hidroxiprolina tecidual nos diversos segmentos do canal alimentar do cão pela técnica fotocolorimétrica utilizando o reativo de Ehrlich. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 10, n. 3, P. 128-134, 1995.

DINARELLO, C.A.; CANNON, J.G.; WOLFF, S.M.; BERNHEIM, H.A.; BEUTLER, B.; CERAMI, A.; FIGARI, I.S.; PALLADINO, M.A.; O'CONNOR, J.V. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. **J Exp Med**, New York, v. 163, n. 6, p. 1433-1450, 1986.

EISEMAN, B.; BEART, R.; NORTON, L. Multiple organ failure. **Surg Gynecol Obst**, Chicago, v. 144, n. 3, p. 323-326, 1977.

ESMON, C.T. The anticoagulant and anti-inflammatory roles of the protein C anticoagulant pathway. **J Autoimmun**, London, v. 15, n. 2, p. 113-116, 2000.

FADEL, M.V. T.; REPKA, J.C.D.; CUNHA, C.L.P.; LEÃO, M.T.C. Inadequate timing between corticosteroid and antibiotics applications increases mortality due to sepsis. **Braz J Infect Dis**, Salvador, v. 12, n. 5, p. 416-422, 2008.

FERRANDO, A.; WOLFE, R. Restoration of hormonal action and muscle protein. **Crit Care Med**, New York, v. 35, n. 9 suppl, p. s630-634, 2007.

FINK, M.P. ; HEARD, S.O. Laboratory models of sepsis and septic shock. **J Surg Res**, Philadelphia, v. 49, p. 186-196, 1990.

FONG, Y.; MOLDAWER, L.L.; SHIRES, G.T.; LOWRY, S.F. The biological characteristics of cytokines and their implication in surgical injury. **Surg Gynecol Obstet**, Chicago, v. 170, n. 4, p. 363-378, 1990.

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.

FRY, D.E.; PEARLSTEIN, L.; FULTON, R.L.; POLK, H.C. Multiple system organ failure: the role of uncontrolled infection. **Arch Surg**, Chicago, v. 115, n. 2, p. 136-140, 1980.

FUJIHARA, M.; MUROI, M.; TANAMOTO, K.I.; SUZUKI, T.; AZUMA, H.; IKEDA, H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. **Pharmacology & therapeutics**, Oxford, vol.100, n. 2, p. 171-194, 2003.

GARRIDO, A.P.; CRUZ JUNIOR, R.J.; POLI DE FIGUEIREDO, L.F.; ROCHA E SILVA, M. Small volume of hypertonic saline as the initial fluid replacement in experimental hypodynamic sepsis. **Crit Care**, London v. 10, n.2, p.R62, 2006.

GARRIDO, AG; FIGUEIREDO, LFP; ROCHA E SILVA, M. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 19, n. 2, p. 82-88. 2004.

GIAQUINTO, M.G.C.; MOTA, D.S.C. Cicatrização de feridas. In: MARQUES, R.M. **Técnica operatória e cirurgia experimental**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, primeira edição, 2005. p. 55-70.

GLAUSER, M.P. Pathophysiologic basis of sepsis: considerations for future strategies of intervention. **Crit Care Med**, Baltimore, v. 8, n. 9, suppl, p. 54-58, 2000.

GRECA, F.H.; BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; IOSHI, S.; SANTOS, E.A.A.; CHIN, E.W.K.; EL TAWIL, I.I.; STALHSCHMIDT, F.L. Cicatrização de anastomoses do cólon esquerdo com doença inflamatória: estudo experimental em ratos. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 15 n. supl 3, p. 41-46, 2000.

HASSELGREN, P.O.; FISHER, J.E. Sepsis: stimulation os energy-dependent protein breakdown resulting in protein loss in skeletal muscle. **World J Surg**, New York, n. 22, v. 2, p. 203-208, 1998.

HENDRICKS, T.; MASTBOOM, W. J. B. Healing of experimental intestinal anastomosis: apramenters for repair. **Dis Colon Rectum**, New York, v.33, p.891-901, 1990.

HILL, A.G.; HILL, G.L. Metabolic response to severe injury. **Br J Surg**, Bristol, v. 85, n. 7, p. 884-890, 1998.

HINSHAW, L.B.; EMERSON Jr, T.E.; TAYLOR Jr, F.B.; CHANG, A.C.; DUERR, M.; PEER, G.T.; FLOURNOY, D.J.; WHITE, G.L.; KOSANKE, S.D.; MURRAY, C.K. Lethal Sthaphylococcus aureus induced shock in primates: prevention of death with anti-TNF antibody. **J Trauma**, Baltimore, v. 33, n. 4, p. 568-573, 1992.

HOTCHKISS, R.S.; KARL, I.E. Reevaluation of the role of cellular hypoxia and bioenergetic failure in sepsis. **JAMA** 1992, v. 267, n. 11, p. 1503-1510.

HSU, S.M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J Histochem Cytochem**, Baltimore, v. 29, n. 4, p. 577-580, 1981.

HURLEY, J.V. ; EDWARDS, B.; HAM, K.N. The response of newly formed blood vessels in healing wounds to histamine and other permeability factors. **Pathology**, Sidney, v. 2, n. 2, p. 133-145, 1970.

IKEMURA, K.; IKEGAMI, T.; SHIMAZU, T.; YOSHIOKA, T.; SUGIMOTO, T. False-positive result in Limulus test caused by Limulus amebocyte lysate-reactive material in immunoglobulin products. **J Clin Microbiol**, Washington, v. 27, n. 9, p. 1965-1968, 1989.

ISHIMURA, K.; TSUBOUCHI, T.; OKANO, K.; MAEBA, T.; MAETA, H. Wound healing of intestinal anastomosis after digestive surgery under septic conditions: participation of local interleukin-6 expression. **World J Surg**, New York, v. 22, n. 10, p. 1069-1075, 1998.

JANSEN, N.J.; VAN OEVEREN, W.; HOITING, B.H.; WILDEVUUR, C.R. Methylprednisolone prophylaxis protects against endotoxin-induced death in rabbits. **Inflammation**, New York, v. 15, n. 2, p. 91-101, 1991.

JUNQUEIRA, L.C.U.; COSSERMELLI, W.; BRENTANI, R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. **Arch Histol Jpn**, Okayama, v. 41, n. 3, p. 267-274, 1978.

JUNQUEIRA, L. C. U.; MONTES, G. S.; SANCHEZ, E. M. The influence of tissue thickness on the study of collagen by the picosirius-polarization method. **Histochemistry**, Berlin, v. 74, s.1, p. 153-156, 1982.

KERATI, P., RUDNAI, P. André Boivin, pioneer of modern endotoxin research. **Orv Hetil**, Budapest, v. 113, n. 46, p. 2784-2786, 1972.

KHATSENKO, O.G.; GROSS, S.S.; RIFKIND, A.B.; VANE, J.R. Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P450-dependent metabolism caused by immunostimulants. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 90, n. 23, p. 11147-11151, 1993.

KINSELLA, K.G. Future Longevity-Demographic Concerns and Consequences. **J Am Geriatr Soc**, New York, v. 53, n. 9 Suppl, p. s299-303, 2005.

KIVIRIKKO, K.I.; RISTELLI, J. Biosynthesis of collagen and its alteration in pathological states: review article. **Med Biol**, Helsinki, v. 54, n. 3, p. 159-186, 1976.

KIYAMA, T.; ONDA, M.; TOKUNAGA, A.; YOSHIYUKI, T.; BARBUL, A. Effect of early postoperative feeding on the healing of colonic anastomoses in the presence of intra-abdominal sepsis in rats. **Dis Colon Rectum**, Philadelphia, v. 43, n. 10 suppl, p. s54-58, 2000.

KOLLEF, M.H.; EISENBERG, P.R.; OHLENDORF, M.F.; WICK, M.R. The accuracy of elevated concentrations of endotoxin in bronchoalveolar lavage fluid for the rapid diagnosis of gram-negative pneumonia. **Am J Respir Crit Care Med**, New York, v. 154, n. 4 (Pt 1), p. 1020-1028, 1996.

KURKI, P.; VANDERLAAN, M.; DOLBEARE, F.; GRAY, J.; TAN, E.M. Expression of proliferating cell nuclear (PCNA)/ cyclin during cell cycle. **Exp Cell Res**, New York, v. 166, n. 1, p. 209-219, 1986.

LEE, R.; WANG, D.; LIN, N.T.; CHEN, H.I. Physiological and chemical indicators of early and late stages of sepsis in conscious rats. **J Biomed Sci**, Basel, v. 9, n. 6 (Pt 2), p. 613-621, 2002.

LEFERING, R.; NEUGEBAUER, E.A. Steroid controversy in sepsis and septic shock: a meta-analysis. **Crit Care Med**, New York, v. 23, n. 7, p. 1294-1303, 1995.

LEITE, C.V.S.; NARESSE, L.E.; KOBAYASI, S.; MINOSSI, J.G.; BURINI, R.C.; CURI, P.R.; HOSSNE, W.S. Efeito da desnutrição protéica na anastomose do cólon distal no rato: estudo da força de ruptura e do colágeno tecidual. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 8, n. 4, p. 145-150, 1993.

LEVINE, A.J.; PERRY, M.E.; CHANG, A.; SILVER, A.; DITTMER, D.; WU, M.; WELSH, D. The 1993 Walter Hubert Lecture: The role of p53 tumour suppressor gene in tumorigenesis. **Br J Cancer**, London, v. 69, n. 3, p. 409-416, 1994.

MACARTHUR, H.; WESTFALL, T.C.; RILEY, D.P.; MISKO, T.P.; SALVEMINI, D. Inactivation of catecholamines by superoxide gives new insights on the pathogenesis of septic shock. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 97, n. 17, p. 9753-9758, 2000.

MACRI, M.M.; MATIAS, J.E.F.; SOUZA, C.J.F.; NICOLUZZI, J.E.L.; CARON, P.E.; REPKA, J.C.D. Influência do pneumoperitônio nas funções hepática e renal e na liberação de citocinas pró-inflamatórias em modelo experimental de endotoxemia induzida por lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*. 2009. (submetido à publicação).

MAISH, G.O.; SHUMATE, M.L.; EHRLICH, H.P.; COONEY, R.N. Tumor Necrosis Factor Binding Protein Improves. Tumor necrosis factor binding protein improves incisional wound healing in sepsis. **J Surg Res**, New York, v. 78, n. 2, p. 108-117, 1998.

MAJNO G. The ancient riddle of sepsis. **J Infect Dis**, Chicago, n. 163, v. 5, p. 937-945, 1991.

MARIK, P.E.; VARON, J. The hemodynamic derangements in sepsis: implications for treatment strategies. **Chest**, Park Ridge, v. 114, n. 3, p. 854-860, 1998.

MARQUES, R.M. Cirurgia - Arte e Ciência. In: _____ **Técnica operatória e cirurgia experimental**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, primeira edição, 2005; p. 3-18.

MARTÍNEZ-LARA, I.; GONZÁLEZ-MOLES, M.A.; RUIZ-AVILA, I.; BRAVO, M.; RAMOS, M.C.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, J.A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a marker of dysplasia in oral mucosa. **Acta Stomatol Bel**, Bruxelle, v. 93, n. 1, p. 29-32, 1996.

MEDZHITOV, R.; PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY JR, C.A. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. **Nature (London)**, v. 388, n. 6640, p. 394-397, 1997.

MICHIE, H.R. Metabolismo of sepsis and multiple organ failure. **World J Surg**, New York, n. 20, v. 4, p. 460-464, 1996.

MILLER, E. J.; GAY, S. Collagen: an overview. **Method enzymol**, New York, v. 82, p.3-32, 1982.

MINICUCCI, M.F.; AZEVEDO, P.S.; DUARTE, D.R.; SORIANO, E.A.; ZORNOFF, L.A.M.; CAMPANA, A.O.; PAIVA, S.A.R. Nutritional therapy for the Critical Patient – The role of macronutrients. **J Brazilian Soc Food Nutr**, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 97-109, 2006.

MINOSSI, J.G.; LEITE, C.V. S.; NARESSE, L.E.; RODRIGUES, M.A.M.; ANGELELI, A.Y.O.; KOBAYASI, S. Efeito do diclofenaco de sódio na cicatrização da parede abdominal de ratos: Estudo histopatológico, da força de ruptura e do colágeno tecidual. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 16, n.3, p. 146-154, 2001.

MITAKA, C.; HIRATA, Y.; YOKOYAMA, K.; NAGURA, T.; TSUNODA, Y.; AMAHA, K.; Beneficial effect of carboxy PTIO on hemodynamic and blood gas changes in septic shock dogs. **Crit Care**, London. V. 1, n. 1, p. 45–50, 1997.

MONACO, J.A.L.; LARENCE, W.T. Acute wound healing: an overview. **Clin Plast Surg**, Philadelphia, v. 30, n. 1, p. 1-12, 2003.

MORRISON, D.C.; LEIVE, L. Fractions of lipopolysaccharide from *Escherichia coli* O111:B4 prepared by two extraction procedures. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 250, n. 8, p. 2911-2919, 1975.

NATHENS, A.B.; MARSHALL, J.C. Sepsis, SIRS, and MODS: What's in a name? **World J Surg**, New York, v. 20, n. 4, p. 386-391, 1996.

NOBREGA, N.L.; BIONDO-SIMÕES, M.L.P.; BARCZAK, D.; IOSHII, S.O. Effects of hyperglycemia and aging in angiogenesis and reepithelization of colonic anastomoses in rats. **Acta Cir Bras**, São Paulo, v. 22, suppl.1, p. 2-7, 2007.

NOLAN, J.P. Endotoxin, reticuloendothelial function and liver injury; **Hepatology**, Baltimore, v. 1, n. 5, p. 458-465, 1981.

O'NEILL, L.A.; BOWIE, A.G. The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. **Nat Rev Immunol**, London, v. 7, n. 5, p. 353-364, 2007.

OLESEN, E.T.; DE SEIGNEUX, S.; WANG, G.; LÜTKEN, S.C.; FROKIAER, J.; KWON, T.H.; NIELSEN, S. Rapid and segmental specific dysregulation of AQP2, S256-pAQP2 and renal sodium transporters in rats with LPS-induced endotoxaemia. **Nephrol Dial Transplant**, Oxford, v. 24, n. 8, p. 2338-2349, 2009.

OLIVEIRA, P.C. **Pressão arterial e manipulação tubular renal de sódio em um modelo de septicemia em ratos**. 168 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2001.

OLSON, N.C.; HELLYER, P.W.; DODAM, J.R. Mediators and vascular effects in response to endotoxin. **Br Vet J**, London, v. 151, n. 5, p. 489-522, 1995.

PARRILLO, J.E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **N Engl J Med**, Boston, v. 328, n. 20, p. 1471-1477, 1993.

PEREIRA JUNIOR, G.A.; MARSON, F.; ABEID, M.; OSTINI, F.M.; SOUZA, S.H.; BASILE-FILHO, A. Fisiopatologia da sepse e suas implicações terapêuticas. **Medicina, Ribeirão Preto**, v. 31, p. 349-362. 1998.

POLTORAK, A.; H.E.; X.; SMIRNOVA, I.; LIU, M.Y.; VAN HUFFEL, C.; DU, X.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; GALANOS, C.; FREUDENBERG, M.; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.; LAYTON, B.; BEUTLER, B. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in *Tlr4* gene. **Science**, Washington, v. 282, n. 5396, p. 2085-2088, 1998a.

POLTORAK, A.; SMIRNOVA, I.; HE, X.; LIU, M.Y.; VAN HUFFEL, C.; MCNALLY, O.; BIRDWELL, D.; ALEJOS, E.; SILVA, M.; DU, X.; THOMPSON, P.; CHAN, E.K.; LEDESMA, J.; ROE, B.; CLIFTON, S.; VOGEL, S.N.; BEUTLER, B. Genetic and physical mapping of the *Lps* locus: identification of the toll-4 receptor as a candidate gene in the critical region. **Blood Cells Mol Dis**, California, v. 24, n. 3, p. 340-355, 1998b.

POMPEO, M. Misconceptions about protein requirements for wound healing: results of prospective study. **Ostomy Wound Manage**, King of Prussia, v. 53, n. 11, p. 49-54, 2007.

QUEZADO, Z.M.N.; BANKS, S.M.; NATANSON, C. New strategies for combatting sepsis: the magic bullets missed the mark...but the search continues. **Trends Biotechnol**, Amsterdam, v. 13, n. 2, p. 56-63, 1995.

RAETZ, C.R.H.; WHITFIELD, C. Lipopolysaccharide endotoxins. **Annu Rev Biochem**, Palo Alto, v. 71, p. 635-700, 2002.

REIETSCHER, E.T.; CAVAILLON, J.M. Endotoxin and anti-endotoxin. The contribution of the schools of Koch and Pasteur: Life milestone-experiments and concepts of Richard Pfeiffer (Berlin) and Alexandre Besredka (Paris). **Journal of Endotoxin Research**, Borstel. v. 8, n. 1, p. 71-82, 2002.

REMICK, D.G.; NEWCOMB, D.E.; GERALD, L.B.; CALL, D.R. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs cecal ligation and puncture. **Shock**, Augusta, v. 13, n. 2, p. 110-116, 2000.

REPKA, J.C.D; LIMA, J.B.A.; FRANCO DE SOUZA, C.J.; CARON, P. E.; MATIAS, J.E.F. Comparison between two methods for sepsis induction in rats. 2009. (submetido à publicação).

ROCK, F.L.; HARDIMAN, G.; TIMANS, J.C.; KASTELEIN, R.A.; BAZAN, J.F. A family of human receptors structurally related Drosophila Toll. **Proc Natl Acad Sci USA**, Washington, v. 95, n. 2, p. 588-593, 1998.

ROSENFELD, Y.; PAPO, N.; SHAI, Y. Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host-defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 281, n. 3, p. 1636-1643, 2006.

ROVAI, L.E.; HERSCHMAN, H.R.; SMITH, J.B. The murine neutrophil-chemoattractant chemokines LIX, KC and MIP2 have distinct induction kinetics, tissue distributions and tissue specific sensitivities to glucocorticoid regulation in endotoxemia. **J Leukoc Biol**, New York, v. 64, n. 4, p. 494-502, 1998.

SALES JUNIOR, J. L.; GRUPO DE ESTUDO DE SEPSE DO FUNDO AMIB et al. Epidemiological Study of Sepsis in Intensive. Care Units. Sepsis Brazil Study. **Rev Bras Ter Intensiva**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 9-17, 2006.

SHAW, J.H.F.; KOEA, M.H.B. Metabolic basis for management of the septic surgical patient. **World J Surg**, New York, v. 17, n. 2, p. 154-64, 1993.

SHEDLOFSKY, S.I.; ISRAEL, B.C.; MCCLAIN, C.J.; HILL, D.B.; BLOUIN, R.A. Endotoxin administration to humans inhibits hepatic cytochrome P450-mediated drug metabolism. **J Clin Invest**, New York, v. 94, n. 6, p. 2209-2214, 1994.

SILVA, E.; FERNANDES JUNIOR, C.J.; AKAMINE, N.; SOGAYAR, A.M.C.B.; KNOBEL, E. Sepsis e choque séptico. In: KNOBEL, E. **Condutas no paciente grave**. São Paulo: Atheneu, terceira edição, 2007. p. 61-78.

SILVA, E.; PEDRO, M.A.P.; SOGAYAR, A.C.B.; MOHOVIC, T.; SILVA, C.L.O.; JANISZEWSKI, M.; RODRIGUES CAL, R.G.R.; SOUSA, E.F.; ABE, T.P.; ANDRADE, J.; MATOS, J.D.; REZENDE, E.; ASSUNÇÃO, M.A.; AVEZUM, A.; ROCHA, P. C.S.; MATOS, G.F.J.; BENTO, A.M.; CORRÊA, A.D.; VIEIRA, P. C.B.; KNOBEL, E. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Crit Care**, London, v. 8, n. 4., p. 251-260, 2004.

SIMÕES, J.C.; SANTIS, P. B.; GAMA, R.R.; BINI, A.L.; CARDOSO, M.B.; REPKA, J.C. Colostomia tipo hartmann em ratos: alterações morfológicas e dosagem de hidroxiprolina. **Rev Col Bras Cir**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 4, p. 253-259. 2000.

SMEDEGÅRD, G.; CUI, L.X.; HUGLI, T.E. Endotoxin-induced shock in the rat. A role for C5a. **Am J Pathol**, Baltimore, v. 135, n. 3, p. 489-497, 1989.

SOUBA, W.W. Cytokine control of nutrition and metabolism during critical illness. **Curr Probl Surg**, Chicago, v. 31, n. 7, p. 577-643, 1994.

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 kB activity. **J Lab Clin Med**, St. Louis, v. 129, n. 4, p. 470-481, 1997.

STETTEN, MR. Some aspects of the metabolism of hydroxyproline, studied with the aid of isotopic nitrogen. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 181, p. 31-37. 1949.

STEVENS, A.; LOWE, J. Respostas teciduais ao dano. In: **Patologia**. São Paulo, Manole, segunda edição, 2000, p. 35-50.

STAHLKE, P.H. **Endotoxemia em ratos submetidos à isquemia e reperfusão em membros caudais**. 70 f. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

THÁ NASSIF, A.C.; HINTZ GRECA, F.; GRAF, H.; DOMINGUES REPKA, J.C.; NASSIF, L.S. Wound healing in colonic anastomosis in hypothyroidism. **Eur Surg Res**, Basel, v. 42, n. 4, p. 209-215, 2009.

THORNTON, F.J.; AHRENDT, G.M.; SCHÄFFER, M.R.; TANTRY, U.S; BARBUL, A. Sepsis impairs anastomotic collagen gene expression and synthesis: a possible role for nitric oxide. **J Surg Res**, New York, v. 69, n. 1, p. 81-86, 1997.

TRUBIAN, P.S. **Nutrição perioperatória e cicatrização de anastomoses colônicas em ratos desnutridos e toxêmicos: tensiometria, densitometria do colágeno e quantificação de angiogênese e miofibroblastos**. 141 f. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

TSUJIMOTO, M.; VILCEK, J. Tumor necrosis factor receptors in HeLa cells and their regulation by interferon-gamma. **J Biol Chem**, Baltimore, v. 261, n. 12, p. 5384-5388, 1986.

VAN DER POLL, T.; MARCHANT, A.; BUURMAN, W.A.; BERMAN, L.; KEOGH, C.V. ; LAZARUS, D.D.; NGUYEN, L.; GOLDMAN, M.; MOLDAWER, L.L.; LOWRY, S.F. Endogenous IL 10 protects mice from death during septic peritonitis. **J Immunol**, Baltimore, v. 155, n. 11, p. 5397-5401, 1995.

VANASCO, V.; CIMOLAI, M.C.; EVELSON, P; ALVAREZ, S. The oxidative stress and the mitochondrial dysfunction caused by endotoxemia are prevented by alpha-lipoic acid. **Free Radic Res**, Yverdon, v. 42, n. 9, p. 815-823, 2008.

VIZZOTTO JUNIOR, A.O.; NORONHA, L.; SCHEFFEL, D.L.H.; CAMPOS, A.C.L. Influência da cisplatina administrada no pré e no pós-operatório sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 2, p. 143-149, 2003.

WAAGE, A.; BRANDTZAEG, P; HALSTENSEN, A.; KIERULF, P.; ESPEVIK, T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. **J Exp Med**, New York, v. 169, n. 1, p. 333-338, 1989.

WAGNER, O.J.; EGGER, B. Influential Factors in Anastomosis Healing. **Swiss Surg**, Bern, v. 9, n. 3, p. 105-113, 2003.

WALKER, F.; NICOLA, N.A.; METCALF, D.; BURGESS, A.W. Hierarchical down-modulation of hemopoietic growth factor receptors. **Cell**, Cambridge, V. 43, n. 1, p. 269-276. 1985.

WANG, X.D.; ANDERSSON, R. The role of endotelial cells in the systemic inflammatory response syndrome and multiple system organ failure; **Eur J Surg**, Oslo, v. 161, n. 10, p. 703-713, 1995.

WICHTERMANN, K.A.; BAUE, A.E.; CHAUDRI, I.H. Sepsis and septic shock-a review of laboratory models and a proposal. **J Sur Res**, New York, v. 29, n. 2, p. 189-201, 1980.

WITTE, M.B.; BARBUL, A. General principles of wound healing. **Surg Clin North Am** Philadelphia. v. 77, n. 3, p. 509-528, 1997.

YANG, R.; MIKI, K.; OKSALA, N.; NAKAO, A.; LINDGREN, L.; KILLEEN, M.E.; MENNANDER, A.; FINK, M.P.; TENHUNEN, J. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, Bethesda, v. 297, n. 2, p. 362-369, 2009.

ZANON, F.; CAOVILO, J.J.; MICHEL, R.S.; CABEDA, E.V. ; CERETTA, D.F.; LUCKEMEYER, D.G.; BELTRAME, C.; POSENATTO, N. Sepse na unidade de terapia intensiva: etiologias, fatores prognósticos e mortalidade. **Rev Bras Ter**, São Paulo, v. 20, n. 2, p. 128-134, 2008.

ZHANG, X.; CHINKES, P. ; IRTRIN, O.; WOLFE, R. Anabolic action of insulin on skin wound protein is augmented by exogenous amino acids. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, Bethesda, v. 283, n. 6, p. E1135-1143, 2002.

DOCUMENTOS CONSULTADOS

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/princípios;htm>; Acessado em: fevereiro de 2009.

HENRY, R.J.; CANNON, D.C.; WINKELMAN, J.W. **Clinical Chemistry: principles and techniques**. New York: Harper & Row, first edition, 1974, p. 362–634.

NORMAS para apresentação de documentos científicos. Universidade Federal do Paraná, Sistema de Bibliotecas. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2007. v. 2: Teses, dissertações, monografias e outros trabalhos acadêmicos.

NORMAS para apresentação de documentos científicos. Universidade Federal do Paraná, Sistema de Bibliotecas. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2007. v. 3: Citações e notas de rodapé.

NORMAS para apresentação de documentos científicos. Universidade Federal do Paraná, Sistema de Bibliotecas. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2007. v. 4: Referências.

NORMAS para apresentação de documentos científicos. Universidade Federal do Paraná, Sistema de Bibliotecas. 2. ed. Curitiba: UFPR, 2007. v. 9: Redação e editoração.

STEDMAN - **Dicionário Médico**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 27ª edição, 2003.

WALKER, W.F.; HOMBERGER, D.G. **Anatomy and Dissection of Rat**. 3. ed. New York; W.H. Freeman and Company, 1997. p. 15-17.

Anexo

Anexo 1



HOSPITAL E MATERNIDADE ANGELINA CARON Coordenação de Ensino e Pesquisa

Campina Grande do Sul, 27 de julho de 2006

Parecer nº 011/06

De Comissão de Ética em Pesquisa em Animais
Para Dr. João Carlos Domingues Repka
Assunto Parecer

1. Título do projeto
 - Influência da endotoxemia na cicatrização intestinal de ratos Wistar.
2. Relator
 - Dr. Pedro Ernesto Caron
3. Animais a serem utilizados
 - 70 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar
4. Avaliação dos procedimento (s) previsto (s) :

Procedimento(s)	Avaliação / sugestão(s)
Condições gerais do experimento	Satisfatória e de acordo com as normas do COBEA
Concepção ética do estudo	Satisfatória
Anestesia: Associação xilazina 10 mg/Kg associado a Ketamina 100 mg/Kg, sob a forma de injeção intramuscular em região da coxa.	Satisfatória
Procedimento cirúrgico: Em cada rato será procedida uma laparotomia através de incisão mediana xifopúbica de 4,0 cm iniciando na borda superior da pube, com abertura de todos os planos da parede abdominal e exposição da cavidade abdominal. A 20cm do piloro foi feita secção completa do intestino delgado e anastomose término-terminal, com oito pontos separados em um único plano de síntese, extramucoso, com fio monofilamentar de mononylon 6-0 (figura 2). A laparorráfia será procedida com dois plano de síntese. O primeiro, peritônio-músculo-aponeurótico e o segundo, o da pele, com aplicação de sutura de mononylon 3-0 em chuleio simples.	Satisfatório
Analgesia e Antibioticoterapia: analgésico dipirona 25 mg e 100 mg de antibiótico oxitetraciclina 100 mg.	Satisfatório
Indução da endotoxemia: solução se LPS por via endovenosa através da veia dorsal peniana em doses conforme o sub-grupo	Satisfatório
Eutanásia e coleta de amostras: Após sete dias do procedimento cirúrgico os ratos serão submetidos à coleta de amostras foi feita com os ratos anestesiados com injeções intramusculares de 100mg/kg Cetamina (Ketamin – Cristalia 50mg/ml) associada a 10mg Xilasina (Calmium 2g/100ml). Para a coleta de sangue será realizada punção intra-cardíaca e coletado sangue em seringa de 20 ml com agulha 25x8mm (Beckton-Dikinson) esterilizadas e apirogênicas, em volume de no mínimo 10ml, suficiente para a indução de parada cardíaco-respiratória	Satisfatório
Biossegurança: Serão respeitadas as normas de Biossegurança previstas para a manipulação de animais de laboratório. As carcaças serão removidas para o expurgo hospitalar e transportadas para o aterro sanitário de Curitiba.	Satisfatório Sugerimos envolver cada carcaça em sacos plásticos de lixo hospitalar e fechá-los de maneira hermética.
Somente estarão envolvidos neste experimento profissionais com experiência comprovada nesta metodologia	Satisfatório

5. Parecer Final :

Todos os procedimentos analisados pela Comissão de Ética em Pesquisa foram considerados satisfatórios, sendo este protocolo autorizado para sua execução nas dependências do centro de experimentação animal deste hospital.

Dr. Pedro Ernesto Caron

APÊNDICES

Apêndice 1

MATERIAL E METODOLOGIA PARA INDUÇÃO DE ENDOTOXEMIA

Material

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

Método

- Pesar o 5mg de LPS em frascos de vidro esterilizado e apirogênico, mantê-lo sob refrigeração entre 4-8°C, conforme a necessidade diária do cronograma de inoculações;
- Solubilizar as alíquotas de LPS contidas nos frascos de vidro, em 10ml de solução fisiológica, imediatamente antes de sua inoculação nos ratos;

Inoculação

- Pesar os ratos, anotar o peso em protocolo e proceder aos cálculos para a dose de 1mg/kg de peso;
 - Verificar a identificação da caixa e de cada rato;
 - Sedar rapidamente os ratos em campânula fechada sob saturação de Isoflurano (Forane® Abbott) tomando a precaução de não induzir anestesia;
 - Tracionar o pênis;
 - Identificar a veia dorsal peniana;
 - Inocular o volume calculado da solução de LPS com seringa descartável para insulina de 0,5ml com agulha fixa de 12,7mm x 0,33mm (Beckton Dickinson®) – figura 2.
 - Proceder leve pressão no local da punção para evitar refluxo;
 - Devolver os ratos inoculados para caixa limpa e observá-los por 30 minutos;
 - Os mesmos procedimentos foram feitos nos ratos controles, sendo inoculado solução fisiológica em volume proporcional ao peso;
 - Avaliar todos os animais diariamente, sempre no mesmo horário, anotando em protocolo os seguintes parâmetros: prostração, piloereção, blefarite sanguinolenta, hematúria, morte.
-

Apêndice 2

METODOLOGIA PARA COLETA DE SANGUE POR PUNÇÃO INTRA-CARDÍACA

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.
 - Aspirar sangue até o volume para indução de parada cárdio-respiratória.
 - Imediatamente substituíam-se as agulhas e o sangue era 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;
 - Tubo sem anticoagulante para avaliações as provas de função hepática;
 - Tubo sem anticoagulante esterilizados e apirogênicos para as dosagens de endotoxina e fator de necrose tumoral alfa.
 - Estes tubos eram submetidos à centrifugação após a coagulação do sangue e separado o soro. Os soros foram transferidos para frascos esterilizados e apirogênicos e mantidos a -70°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).
-

Apêndice 3

MATERIAIS E METODOLOGIA PARA DOSAGEM DE ENDOTOXINA

MATERIAL

- Reagente LAL (Lisado de Amebócitos de *Limulus* sp.);
- Endotoxina padrão de *Escherichia coli* (50UE/ml);
- Água apirogênica;
- Tubos de vidro despirogenizados tipo “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.

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.
- Homogeneizou-se evitando a formação de espuma. Aliquotou-se, o lisado, com pipeta automática: 0,1ml do reagente LAL em tubos de hemólise esterilizados e apirogênicos. 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, foi feita uma diluição inicial a 10^{-1} para conter 5UE/ml, denominada diluição de uso.
- Foi preparada uma série de 10 tubos de ensaio despirogenizados nos quais foram distribuídos com pipeta automática, volumes de água apirogênica conforme descrição da tabela 5.

- A seguir foram transferidos volumes de padrão de endotoxina padrão conforme descrito na tabela 2. A cada diluição realizada, o tubo foi agitado em vórtex.
- Foram adicionados aos todos 0,1ml do reagente LAL e 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.

TABELA 5 - DILUIÇÕES DA ENDOTOXINA PADRÃO

Tubo	Água Apirogênica	Volume a ser transferido (ml)	Diluição	Unidades Endotóxicas (UE/ml)	Resultado
1	1ml	1ml da diluição de uso (5UE)	1/2	2,5	Positivo
2	0,5ml	0,5ml do tubo 1	1/4	1,25	Positivo
3	0,5ml	0,5ml do tubo 2	1/8	0,625	Positivo
4	0,5ml	0,5ml do tubo 3	1/16	0,3125	Positivo
5	0,5ml	0,5ml do tubo 4	1/32	0,15625	Positivo
6	0,5ml	0,5ml do tubo 5	1/64	0,078125	Positivo
7	0,5ml	0,5ml do tubo 6	1/128	0,0390625	Positivo
8	0,5ml	0,5ml do tubo 7	1/256	0,01953125	Positivo
9	0,5ml	0,5ml do tubo 8	1/512	0,00976562	Negativo
10	0,5ml	0,5ml do tubo 9	1/1024	0,00488281	Negativo

A sensibilidade do reagente LAL foi definida como a última diluição com reação de gelificação positiva = 0,01953125UE/ml, correspondente ao tubo 8.

Análise qualitativa de endotoxina nas amostras de plasma de ratos

- 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).
- Incubou-se 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:

Análise quantitativa de endotoxina nas amostras de plasma de ratos

- Realizaram-se diluições seriadas do soro, 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.

Apêndice 4

MATERIAIS E METODOLOGIA PARA DOSAGEM DE TNF ALFA

Material

- Placa de Terazaki sensibilizada com anticorpos monoclonais anti- TNF α de rato.
- Padrão de TNF α de rato
- Anticorpos monoclonais anti- TNF α 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;
- Espectrofotômetro para leitura de testes imunoenzimáticos;
- Ortofenilenodiamino;

Método

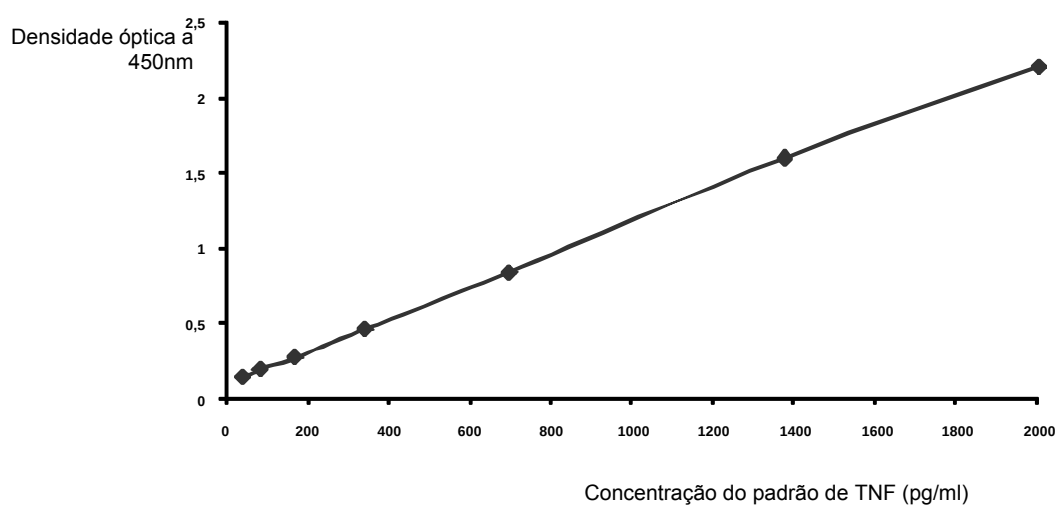
- Distribuir 50 μ l da amostra em cada orifício da placa de Terazaki.
- Distribuir 50 μ l de cada diluição do TNF α padrão que contenham: 43pg/ml, 86pg/ml, 172pg/ml, 344pg/ml, 697pg/ml, 1.375pg/ml e 2.000pg/ml.
- Incubar por 2 horas à temperatura ambiente.
- Esvaziar o conteúdo da placa por inversão e lavar três vezes com tampão fosfatos pH7,5.
- Distribuir 100 μ l do conjugado diluído a 1/3.000 (anticorpo monoclonal anti-TNF α 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 μ l de peróxido de hidrogênio a 30%, em cada um dos orifícios.
- Distribuir 10 μ l de Ortofenilenodiamino (50mg em 25ml de tampão citrato pH5,0) e incubar por 15 minutos.
- Adicionar em cada orifício 10 μ l de ácido sulfúrico 10N
- Ler a absorbância do conteúdo de cada orifício em espectrofotômetro a 450nm e calcular o coeficiente de correlação entre a concentração do padrão de TNF e as absorbâncias lidas.
- Interpolar as leituras dos padrões de TNF α de rato às leituras das amostras.

- Calcular por regressão linear a quantidade de $\text{TNF}\alpha$ presente nas amostras em picogramas/ml.

TABELA 6
PREPARAÇÃO DAS DILUIÇÕES DO PADRÃO DE $\text{TNF}\alpha$ PARA CALIBRAÇÃO DO MÉTODO

Concentração do Padrão de $\text{TNF}\alpha$ (pg/ml)	Tubo	Densidade Ótica a 450nm
43	1	0,149
86	2	0,199
172	3	0,277
344	4	0,466
698	5	0,841
1.375	6	1,598
2.000	7	2,203
Coeficiente de correlação = 0,9873		

GRÁFICO 18
REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE $\text{TNF}\alpha$



Apêndice 5

MATERIAIS E METODOLOGIA PARA DOSAGEM DE HIDROXIPROLINA

Materiais e equipamentos:

Agitador de tubos	- Phoenix – AT 56
Agitador magnético com magneto de 7 cm	- Phoenix
Balança Analítica	- Mettler
Becker	- 500ml – Pyrex
Becker	- 250ml - Pyrex
Erlenmeyer	- 250ml - Pyrex
Erlenmeyer	- 500ml – Pyrex
Espectrofotômetro	- Espectromatic 710 Siel
Pipeta automática 1.000 μ l	- Gilson
Pipetas de 10ml 1/100 – sorológica	- Pyrex
Pipetas de 2ml 1/100 – sorológica	- Pyrex
Pipetas de 5ml 1/100 – sorológica	- Pyrex
Ponteiras de 1.000 μ l	- Gilson
Pró-pipetas	- Biomatic
Proveta 100ml	- Pyrex
Proveta 500ml	- Pyrex
Proveta 50ml	- Pyrex
Tubos de ensaio com tampa de rosca	- 20x200mm Pyrex 9825
pH-metro	- Mettler
Banho-Maria fervente	- Fanen

Reativos:

Solução de Fenolftaleína	- Pesar 1 g, solubilizar em etanol, completar o volume para 100ml com etanol
Solução 12N de Hidróxido de Potássio	- Pesar 168,7g, solubilizar em água deionizada, completar o volume para 250ml com água
Solução 10N de Hidróxido de Potássio	- Pesar 140,25g, solubilizar em água deionizada, completar o volume para 250ml com água
Solução 1N de Hidróxido de Potássio	- Pesar 14,02g solubilizar em água deionizada, completar o volume para 250ml com água
Solução 0,1N de Hidróxido de Potássio	- Pesar 1,402g solubilizar em água deionizada - Completar o volume para 250ml com água
Solução 0,05N de Hidróxido de Potássio	- Pesar 0,701g solubilizar em água deionizada - Completar o volume para 250ml com água
Solução 0,05N de Ácido Clorídrico	- Pipetar 0,76ml de solubilizar em água deionizada - Completar o volume para 250ml com água
Solução 0,2M de Cloramina	- Pesar 1,41g solubilizar Éter monometílico do etilenoglicol - Completar o volume para 25ml com Éter monometílico do etilenoglicol
Solução 3,6M de Tiosulfato de Sódio	- Pesar 89,3g solubilizar em água deionizada - Completar o volume para 100ml com água
Solução Tampão Borato pH 8,7	- Pesar 61,84g de ácido bórico - Pesar 225g de Cloreto de Potássio - Solubilizar em água deionizada

- | | |
|----------------------------------|--|
| Solução Padrão de Hidroxiprolina | <ul style="list-style-type: none"> - Ajustar a pH8,7 com solução de KOH 10N e 1N - Completar o volume para 800ml com água - Pesar 36mg - Solubilizar em água - Completar o volume para 100ml com água - Aliquotar em frascos esterilizados |
| Reativo de Ehrlich: | |

Especificações de produtos químicos:

4-Dimetilaminobenzaldeído	– Merck M 1.03058
Ácido Bórico	– VETEC
Ácido Clorídrico	– Merck 25032517
Ácido Sulfúrico	– Merck K 25382431-827
Alanina	– Merck 1.01007.0025
Cloramina T	– Merck 2426.0250
Cloreto de Potássio	– Merck M 1.04936.1000
Etanol	– M 1.00971.1000
Éter monometílico do etilenoglicol	– Merck 8.00858.1000
Fenolftaleína	– Merck 678-45
Hidróxido de Potássio	– Merck M 1.05033
L-Hidroxiprolina	– Merck 1.04506.0010
Tiosulfato de Sódio	– M 21502
Tolueno	– Merck M1.08325

Método

- Preparar os tubos de ensaio com tampa de rosca, com graduação marcada de 15ml para as soluções branca, padrão e amostras.
- Pesar as amostras em balança eletrônica Mettler® e colocar nos tubos de ensaio identificados.
- Preparar 3 controles positivos com 1ml de solução padrão de Hidroxiprolina e os controles negativos com 1ml de água deionizada.
- Pipetar em cada tubo 1ml de HCl concentrado, em capela com exaustão.
- Fechar os tubos e levar à hidrólise ácida a 90°C durante 20 horas.
- Neutralizar pela adição de 1 gota de solução de fenolftaleína e ajustar o pH entre 8,2 a 9,8 pela adição de solução de KOH 0,1N e completar com água destilada até a marca de 15ml.
- Transferir alíquotas de 3ml dos hidrolizados neutralizados para outros tubos com tampas de rosca e saturar com KCl.
- Em seguida acrescentar a alanina, induzir o processo de oxidação pela cloramina T por 30 minutos e interromper-se com tiosulfato de sódio.

- Cumprir a etapa da oxidação, realizar novo aquecimento das amostras para a formação do pirrol o qual será extraído pelo tolueno e finalmente a reação formadora de cor pela adição do reativo de Ehrlich.
- Medir a absorbância das soluções em espectrofotômetro
- A partir das leituras das absorbâncias de cada amostra proceder o cálculo final da quantidade de hidroxiprolina presente na amostra tecidual em miligramas por grama de tecido pelos seguintes cálculos:

$$\text{Hidroxiprolina (mg)/ml} = \frac{A_x - A_b \times 0,036}{A_p - A_b}$$

Sendo:

A_x: absorbância do cromógeno da amostra tecidual

A_p: absorbância do cromógeno da solução padrão de trabalho de hidroxiprolina

A_b: absorbância da solução branca

0,036: constante referente à concentração da solução padrão de trabalho de hidroxiprolina de 36g/ml

$$\text{Total de Tecido/ml} : \frac{\text{peso em gramas da amostra}}{15\text{ml (diluição inicial)}}$$

$$\mu\text{g de hidroxiprolina/mg de tecido} : \frac{\text{mg de hidroxiprolina/ml}}{\text{mg de tecido/ml}}$$

Apêndice 6

MATERIAIS E METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO HISTOMÉTRICA DA MATURAÇÃO DE COLÁGENO INTESTINAL PELO MÉTODO SIRIUS RED F3BA:

- Focalizar a lâmina no microscópio, escolhendo-se o melhor corte e local, excluindo as áreas de crosta e as glândulas intestinais. Nessa região, selecionar três campos diversos: borda central, superior e inferior.
- Ajustar o aparelho no ícone *Calibration*, com objetiva regulada para uma dimensão 20 vezes maior.
- Selecionar ícone menu *Acquire* e submenu vídeo-digital *Capture*, acionando o modo *Preview* para capturar a imagem mais adequada e em seguida, clicar em *Snap*, em cujo arquivo as imagens são congeladas devidamente.
- Calibrar o sistema orientando-se pela densidade ótica dos pontos de resolução (*pixels*) que formam as imagens, escolhendo-se o valor limite de melhor resolução (*threshold*).
- Identificar cada imagem clicando no menu *File*, submenu *Save As* (salvar como), identificando-se cada animal e respectivo campo em arquivo específico para os registros do estudo.
- As imagens de todos os cortes foram submetidas à idêntica metodologia, conforme se descreve a seguir. Obtiveram-se tais imagens recorrendo-se à ferramenta *zoom*, clicando-se no ícone *Count /Size* [comando que faz contagem automática ou manual de objetos definidos na imagem], depois em *Select Colors*.
- Selecionar a cor vermelha e com o conta-gotas, clicar nas áreas do colágeno até o instante que se obteve, no pequeno quadrado da tela, a imagem em cor magenta uniforme.
- Em seguida, clicar em *New* e na cor branca. Repetindo-se o processo citado anteriormente, selecionaram-se as cores rosa claro homogêneo, excluindo-se os vasos e clicar em *Close*.
- Clicar no menu *Measure*, *Select Measurements*, selecionar a área e *Density (mean)* e depois no botão *OK*. Novo clique em *Count*, *View*, *Measurements Data*, *Statistics* e utilizando-se o *File*, DDE to Excel, transportaram-se os dados para o Excel, a fim de se proceder à análise estatística.
- Utilizou-se o mesmo aplicativo *Image- Pro Plus* e analisou-se não apenas a área total (em micra) mas também as porcentagens de colágeno maduro (tipo I) e do imaturo (tipo III). As fibras colágenas mais espessas e fortemente birrefringentes tingiram-se com alaranjado e vermelho (tipo I), e as fibras mais finas e fracamente

birrefringentes com amarelo e verde (tipo III). Obteve-se uma média dessas porcentagens em cada lâmina, e o valor do colágeno total correspondeu à soma das áreas vermelhas e verdes.

- Com aumento de 200 vezes, escolheram-se, em cada lâmina, três campos distintos (bordos superior, central e inferior) e selecionou-se a melhor resolução de cada imagem. Clicou-se em *Vídeo Digital Capture*, *Preview* e polarizou-se essa imagem com lente Olympus U-Pot que foi rodada em sentido anti-horário até a polarização. Clicou-se em *Snap* e em fechar. Clicou-se em seguida em *File*, *Save as* e no ícone *Calibration* em objetiva de 20X.
 - Em seguida, clicou-se em *Count and Measure Objets*, *Count Size* e no *Select Colors*. Utilizando-se o ícone conta-gotas, coloriu-se inicialmente com pincel 3X3 e depois com 1X1, recorrendo-se à coloração azul, os locais em que se observou coloração alaranjada e vermelha. Depois, selecionou-se *New*, *Class 2* e coloriu-se em magenta o local que apresentava tanto a cor amarela, quanto a cor verde.
 - A seguir, clicou-se em *Close*, *Measure* e *Select Measurements*, depois em *Area*, *Start*, selecionou-se 0 e *OK*, *Count*, em seguida, *View* e *Range Statistics*. Os números representativos da área (em micra) e da porcentagem de colágeno tipo I e do tipo III foram transportados ao Excel para análise estatística (DDE para Excel).
-

Apêndice 7

MATERIAIS E METODOLOGIA PARA AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO ANTÍGENO NUCLEAR DE PROLIFERAÇÃO CELULAR (PCNA):

Método:

- Os cortes foram desparafinizados, hidratados e mergulhados em tampão fosfato.
- Após a recuperação antigênica com tampão citrato e bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 0,3%, os anticorpos primários monoclonais anti-PCNA foram aplicados sobre os cortes e incubados durante a noite. O anticorpo primário utilizado foi o PC10 (Dako Corporation, Glostrup, Denmark), anti-PCNA, diluído em 1:100 e incubado por 18 horas a 4°C.
- Em seguida, os cortes foram enxaguados em tampão fosfato e anticorpo secundário biotilado foi aplicado e incubado por 60 minutos. Após novo enxágüe, o complexo estreptavidina-peroxidase foi aplicado e a reação imuno-histoquímica foi revelada com a aplicação de diaminobenzidina. Após contracoloração com hematoxilina, os cortes foram desidratados, diafanizados e cobertos com lamínulas de vidro com bálsamo do Canadá.
- As reações foram consideradas positivas, quando se detectou reação marrom, excluindo-se as prováveis áreas de coloração de fundo. Para o PCNA o padrão de reação foi nuclear.
- Quantificam-se os núcleos celulares da superfície epitelial e das criptas das glândulas, corados de azul, os quais representam células em repouso; e os corados de marrom, que identificam as células em proliferação da fase G1 tardia até a fase M da G2. Com microscópio óptico e aumento de 1000 X (imersão), utilizando o programa de captura de imagens *Image Pro-Plus*® versão 4.5 – Mídia Cybernetics, contaram-se os núcleos positivos e negativos de 2 campos à direita e 2 à esquerda da linha de anastomose e de 2 criptas glandulares, à direita e à esquerda, nos cortes e obteve-se o percentual dos núcleos positivos e negativos, ou seja, em replicação e em repouso. Cada campo tinha uma área de 7.578,94 μ^2 .
- A análise quantitativa foi feita por meio de imagens microscópicas captadas por uma câmara JVC TK-1270/RGB, digitalizadas no aumento de 1.000x, através do *software* KS300, contido no analisador de imagens Kontron Elektronik/Carl Zeiss. Para cada caso foram analisadas em cem células a porcentagem PCNA positivas.

Apêndice 8

QUADRO 3 - GRUPOS EXPERIMENTAIS - PESAGENS DIÁRIAS (gramas)

Grupo/ Sub-grupo		Pesagens Diárias														
		D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14
PRÉ	SF	145,03	145,06	149,17	158,52	159,50	165,47	168,23	173,26	173,95	179,08	181,34	188,47	190,26	191,29	191,33
		148,05	148,17	152,14	156,23	157,20	161,33	168,30	171,45	169,71	172,10	176,74	181,38	183,11	184,09	184,13
		153,12	153,16	157,21	161,30	162,30	166,43	173,41	176,55	174,81	177,20	181,26	185,32	187,08	188,09	188,13
		123,21	123,36	127,30	131,39	132,20	136,34	143,31	146,46	144,72	147,11	153,05	159,00	160,51	161,38	161,41
		135,40	135,43	139,49	143,58	144,47	148,60	155,58	158,72	156,98	159,37	165,32	171,26	172,89	173,82	173,86
		143,70	143,73	147,79	151,88	152,82	156,95	163,93	167,07	165,33	167,73	173,67	179,62	181,32	182,30	182,34
		168,07	168,20	172,16	176,25	177,34	181,47	188,45	191,59	189,85	192,25	198,19	204,14	206,08	207,19	207,23
		146,34	146,43	150,43	154,52	155,48	159,61	166,58	169,73	167,99	170,38	176,33	182,27	184,00	185,00	185,03
		143,72	143,75	147,81	151,90	152,84	156,97	163,95	167,09	165,35	167,75	173,11	178,48	180,17	181,14	181,18
		126,25	126,28	130,34	134,43	135,26	139,39	146,37	149,51	147,77	150,17	155,53	160,90	162,43	163,30	163,34
		143,29	143,36	147,38	152,00	152,94	157,26	163,81	167,14	165,65	168,31	173,46	179,08	180,79	181,76	181,80
		12,92	12,93	12,92	13,11	13,19	13,30	13,08	13,16	13,31	13,52	13,16	13,19	13,32	13,39	13,39
	LPS	113,00	112,00	111,00	111,26	110,17	108,68	107,11	106,06	104,32	102,58	104,32	107,24	108,10	109,28	109,83
		162,00	162,00	163,00	160,26	158,69	156,55	154,28	152,77	151,03	149,29	152,48	156,74	158,00	159,74	160,54
		126,00	124,00	123,00	124,26	123,04	121,38	119,62	118,45	116,71	114,97	119,61	122,96	123,94	125,30	125,93
		129,00	128,00	129,00	127,26	126,01	124,31	122,51	121,31	119,57	117,83	122,47	125,90	126,90	128,30	128,94
		125,00	127,00	126,00	123,26	122,05	120,40	118,66	117,50	115,76	114,02	119,53	122,87	123,86	125,22	125,84
		155,00	154,00	146,00	153,26	151,76	149,71	147,54	146,09	144,35	142,61	144,35	148,39	149,58	151,23	151,98
134,00		136,00	135,00	132,26	130,96	129,20	127,32	126,07	124,33	122,59	124,33	127,82	128,84	130,26	130,91	
138,00		137,00	136,00	136,26	134,92	133,10	131,17	129,89	128,15	126,41	128,15	131,74	132,79	134,25	134,92	
166,00		166,00	163,00	164,26	162,65	160,45	158,13	156,58	154,84	153,10	154,84	159,17	160,45	162,21	163,02	
144,00		143,00	144,00	142,26	140,87	138,96	136,95	135,61	133,87	132,13	133,87	137,62	138,72	140,24	140,94	
139,20		138,90	137,60	137,46	136,11	134,28	132,33	131,03	129,29	127,55	130,39	134,04	135,12	136,60	137,29	
17,34		17,42	16,80	17,34	17,17	16,94	16,69	16,53	16,53	16,53	16,02	16,47	16,60	16,79	16,87	
PÓS	SF	155,00	157,02	158,87	169,42	163,00	165,00	168,00	173,00	173,69	179,00	181,00	188,00	188,85	195,00	201,00
		138,00	139,79	142,09	146,18	150,67	154,81	161,78	162,03	160,29	162,68	167,32	171,96	172,73	175,78	180,27
		145,00	146,89	149,09	153,18	157,67	161,81	168,78	171,93	170,19	172,58	176,64	180,70	181,51	186,01	190,50
		138,00	139,79	142,09	146,18	150,67	154,81	161,78	164,93	163,19	165,58	171,52	177,47	178,27	185,66	190,16
		167,00	169,17	171,09	175,18	179,67	183,81	190,78	193,93	192,19	194,58	200,52	206,47	207,40	214,21	218,71
		159,00	161,07	163,09	167,18	171,67	175,81	182,78	185,93	184,19	186,58	192,52	198,47	199,36	204,00	206,61
		167,00	169,17	171,09	175,18	179,67	183,81	190,78	193,93	192,19	194,58	200,52	206,47	207,40	211,46	214,07
		164,00	166,13	168,09	172,18	176,67	180,81	187,78	188,00	186,26	188,65	194,60	200,54	200,36	206,31	208,92
		184,00	186,39	188,09	192,18	196,67	200,81	207,78	210,93	209,19	211,58	216,94	222,31	223,31	223,61	226,22
		164,00	166,13	168,09	172,18	176,67	180,81	187,78	190,93	189,19	191,58	196,94	202,31	203,22	209,16	211,77
		158,10	160,16	162,17	166,90	170,31	174,22	180,80	183,55	182,05	184,74	189,85	195,47	196,24	201,12	204,82
		14,49	14,68	14,49	14,47	14,67	14,81	15,13	15,28	15,11	14,96	15,41	15,62	15,65	15,02	14,31
	LPS	184,00	185,66	187,26	201,11	201,86	202,25	202,85	219,82	218,08	216,34	211,70	207,06	203,87	200,68	197,92
		127,00	128,14	131,72	138,81	139,89	140,46	141,32	151,72	149,98	148,24	143,60	138,96	135,77	132,58	129,83
		169,00	170,52	172,55	184,72	185,53	185,96	186,61	201,90	200,16	198,42	193,78	189,14	185,95	182,76	180,00
		136,00	137,22	140,41	148,65	149,66	150,19	150,99	162,47	160,73	158,99	154,35	149,71	146,52	143,33	140,58
		155,00	156,40	158,87	169,42	170,30	170,77	171,47	185,17	183,43	181,69	180,23	175,59	172,40	169,21	166,46
		158,00	159,42	161,80	172,69	173,56	174,02	174,71	188,75	187,01	185,27	180,63	175,99	172,80	169,61	166,86
144,00		145,30	148,17	157,39	158,35	158,85	159,61	172,03	170,29	170,30	165,66	161,02	157,83	154,64	151,89	
133,00		134,20	137,51	145,37	146,40	146,95	147,76	158,89	157,15	155,41	150,77	146,13	142,94	139,75	136,99	
136,00		137,22	140,41	148,65	149,66	150,19	150,99	162,47	160,73	158,99	154,35	149,71	146,52	143,33	140,58	
141,00		142,27	145,26	154,11	155,09	155,60	156,37	168,45	166,71	164,97	160,33	155,69	152,50	149,31	146,55	
148,30		149,63	152,40	162,09	163,03	163,53	164,27	177,17	175,43	173,86	169,54	164,90	161,71	158,52	155,76	
17,96		18,12	17,50	19,63	19,53	19,47	19,39	21,46	21,46	21,42	21,57	21,57	21,57	21,57	21,57	
PRÉ-PÓS	SF	136,00	137,37	140,41	148,65	163,00	165,00	168,00	162,47	163,21	179,00	181,00	188,00	191,00	195,00	201,00
		145,00	146,46	149,09	153,18	157,67	161,81	168,78	171,93	170,19	172,58	177,22	181,86	186,50	189,54	194,04
		162,00	163,63	166,09	170,18	174,67	178,81	185,78	188,93	187,19	189,58	193,64	197,70	201,76	201,90	206,40
		154,00	155,55	158,09	162,18	166,67	170,81	177,78	180,93	179,19	181,58	187,52	193,47	199,41	199,56	204,05
		153,00	154,54	157,09	161,18	165,67	169,81	176,78	179,93	178,19	180,58	186,52	192,47	192,32	194,79	199,28
		148,00	149,49	152,09	156,18	160,67	164,81	171,78	174,93	173,19	175,58	181,52	187,47	193,41	198,05	200,66
		167,00	168,68	171,09	175,18	179,67	183,81	190,78	193,93	192,19	194,58	200,52	206,47	209,51	213,57	216,18
		164,00	165,65	168,09	172,18	176,67	180,81	187,78	190,93	189,19	191,58	197,52	203,47	204,12	210,07	212,68
		179,00	180,80	183,09	187,18	191,67	195,81	202,78	205,93	204,19	206,58	211,94	217,31	224,70	224,57	227,18
		181,00	182,82	185,09	189,18	193,67	197,81	204,78	207,93	206,19	208,58	213,94	219,31	226,12	232,07	234,68
		158,90	160,50	163,02	167,53	173,01	176,92	183,50	185,78	184,29	188,02	193,14	198,75	202,89	205,91	209,62
		14,49	14,63	14,43	13,75	12,55	12,76	13,22	14,57	14,14	12,46	12,79	12,67	13,69	13,89	13,06
	LPS	145,00	146,64	149,14	145,30	146,33	146,88	145,74	141,96	130,60	125,38	122,87	120,41	118,00	115,64	113,33
		132,00	133,49	136,55	132,20	133,33	133,93	131,20	129,16	120,76	115,93	113,61	111,34	109,12	106,93	104,79
		121,00	122,37	125,96	119,32	120,58	121,24	120,32	116,58	106,08	101,84	99,80	97,81	95,85	93,93	92,06
		132,00	133,49	136,55	131,40	132,54	132,10	132,25	120,30	120,02	119,21	116,83	114,49	112,20	109,96	107,76
		153,00	154,73	156,92	153,00	144,30	144,85	143,40	149,48	137,52	132,02	129,38	126,79	124,26	121,77	119,34
		156,00	157,76	159,85	141,50	142,56	140,54	141,39	142,12	129,04	123,88	121,41	118,98	116,60	114,27	111,98
145,00		146,64	149,14	141,21												

Apêndice 9

QUADRO 4 - GRUPO CONTROLE - PESAGENS DIÁRIAS (gramas)

Grupo	Pesagens Diárias														
	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14
Controle	145,03	145,06	149,17	158,52	163,00	165,00	168,00	168,00	178,83	178,16	179,00	181,34	188,47	190,26	191,29
	148,05	148,17	152,14	156,23	160,72	164,86	171,83	178,80	180,21	181,95	182,60	187,24	191,88	193,71	194,75
	153,12	153,16	157,21	161,30	165,79	169,93	176,90	183,87	185,28	187,02	187,67	191,73	195,79	197,65	198,72
	123,21	123,36	127,30	131,39	135,88	140,02	146,99	153,96	155,37	157,11	157,76	163,71	169,65	171,27	172,19
	135,40	135,43	139,49	143,58	148,07	152,21	159,18	166,15	167,56	169,30	169,95	175,90	181,84	183,57	184,56
	143,70	143,73	147,79	151,88	156,37	160,51	167,48	174,45	175,86	177,60	178,25	184,20	190,14	191,95	192,99
	168,07	168,20	172,16	176,25	180,74	184,88	191,85	198,82	200,23	201,97	202,62	208,57	214,51	216,55	217,72
	146,34	146,43	150,43	154,52	159,01	163,15	170,12	177,09	178,50	180,24	180,89	186,84	192,78	194,61	195,67
	143,72	143,75	147,81	151,90	156,39	160,53	167,50	174,47	175,88	177,62	178,27	183,64	189,00	190,80	191,83
	126,25	126,28	130,34	134,43	138,92	143,06	150,03	157,00	158,41	160,15	160,80	166,17	171,53	173,16	174,10
	143,29	143,36	147,38	152,00	156,49	160,41	166,99	173,27	175,61	177,11	177,78	182,93	188,56	190,35	191,38
	12,92	12,93	12,92	13,11	13,10	13,00	12,91	13,04	12,95	12,91	12,91	12,79	12,69	12,81	12,88

Apêndice 10

T0 - PESAGENS (gramas)

Ratos	PRÉ		PÓS		PRÉ E PÓS		C
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	
1	145,03	123,00	155,00	184,00	136,00	145,00	144,00
2	148,05	162,00	138,00	127,00	145,00	132,00	152,00
3	153,12	133,00	145,00	131,00	141,00	121,00	156,00
4	123,21	139,00	138,00	136,00	154,00	132,00	138,00
5	135,40	135,00	167,00	155,00	153,00	153,00	134,00
6	143,70	155,00	131,00	136,00	148,00	156,00	141,00
7	168,07	134,00	147,00	144,00	134,00	145,00	137,00
8	146,34	138,00	129,00	133,00	129,00	145,00	132,00
9	143,72	166,00	136,00	136,00	143,00	151,00	144,00
10	126,25	144,00	144,00	141,00	134,00	142,00	148,00
Média	143,29	142,90	143,00	142,30	141,70	142,20	142,60
DP	12,92	13,83	11,45	16,57	8,46	10,88	7,76
p	0,9489		0,9137		0,9099		

LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS - GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS – LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

Apêndice 11
T7 - PESAGENS (gramas)

Ratos	PRÉ		PÓS		PRÉ E PÓS		C
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	
1	173,26	115,59	173,00	219,82	162,47	141,96	168,00
2	171,45	152,77	162,03	151,72	171,93	129,16	182,75
3	176,55	125,12	171,93	156,50	167,93	116,58	186,75
4	146,46	130,84	164,93	162,47	180,93	120,30	168,75
5	158,72	127,03	193,93	185,17	179,93	149,48	164,75
6	167,07	146,09	157,93	162,47	174,93	142,12	171,75
7	191,59	126,07	173,93	172,03	160,93	138,02	167,75
8	169,73	129,89	188,00	158,89	155,93	110,25	162,75
9	167,09	156,58	162,93	162,47	169,93	139,91	174,75
10	149,51	135,61	170,93	168,45	160,93	140,45	178,75
Média	167,14	134,56	171,95	170,00	168,58	132,82	172,68
DP	13,16	13,18	11,41	19,80	8,49	13,02	7,92
p	0,0000		0,7899		0,0000		

LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS - GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS – LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

Apêndice 12
T14 - PESAGENS (gramas)

Ratos	PRÉ		PÓS		PRÉ E PÓS		C
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	
1	189,33	119,87	201,00	197,92	201,00	113,33	191,29
2	184,13	160,54	180,27	129,83	194,04	104,79	208,40
3	188,13	132,96	190,50	134,60	185,40	92,06	201,30
4	161,41	138,98	190,16	140,58	204,05	107,76	187,20
5	173,86	135,88	218,71	166,46	199,28	119,34	183,14
6	182,34	151,98	178,49	140,58	200,66	111,98	204,30
7	207,23	130,91	193,98	151,89	183,18	104,24	221,70
8	185,03	134,92	208,92	136,99	212,68	85,00	203,40
9	181,18	163,02	226,22	140,58	227,18	110,55	192,11
10	163,34	140,94	191,68	146,55	187,68	119,68	188,20
Média	181,80	141,00	197,99	148,60	199,52	106,87	198,10
DP	13,39	13,61	15,71	20,12	13,33	11,11	11,84
p	0,0000		0,0000		0,0000		

LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS - GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS – LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

Apêndice 13
CONTAGEM TOTAL DE LEUCÓCITOS ($\times 10^3/\text{mm}^3$)

Ratos	PRÉ		PÓS		PRÉ E PÓS		C
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	
1	5,23	7,21	5,36	19,52	3,52	25,62	5,36
2	6,13	4,32	4,25	18,45	6,45	33,24	7,45
3	5,47	3,65	3,54	26,94	5,74	26,55	6,23
4	6,84	4,54	6,41	14,36	4,51	39,89	5,02
5	8,92	3,46	5,17	18,23	5,63	29,48	4,29
6	5,93	5,83	3,62	23,11	6,36	38,13	5,62
7	5,37	6,29	4,83	22,58	6,29	25,01	5,74
8	3,93	4,34	3,46	31,8	5,81	24,65	5,31
9	3,74	4,11	4,2	14,48	3,92	21,34	4,89
10	3,62	6,23	6,13	39,14	4,21	25,24	5,47
Média	5,52	5,00	4,70	22,86	5,24	28,92	5,56
DP	1,61	1,28	1,06	7,86	1,10	6,19	0,85
p	0,4346		0,0000		0,0000		

LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉCIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS - GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS – LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

Apêndice 14
CONTAGEM TOTAL DE PLAQUETAS ($\times 10^3/\text{mm}^3$)

Ratos	PRÉ		PÓS		PRÉ E PÓS		C
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	
1	381	321	395,2	83,6	556,2	55,2	451
2	350	432	384,5	71,5	332,4	64,5	365
3	453	365	569,4	95,4	565,5	36,4	526
4	563	454	443,6	130,1	398,9	46,1	367
5	325	346	382,3	63,7	694,8	36,3	481
6	534	583	331,1	96,2	381,3	33,6	344
7	418	629	425,8	88,3	450,1	66,9	487
8	644	434	318,9	68,6	246,5	28,1	532
9	465	411	644,8	72	513,4	48,2	473
10	386	623	391,4	41,3	252,4	52,1	376
Média	451,9	459,8	428,7	81,7	439,2	46,7	440,05
DP	101,7	113,3	102,7	23,8	144,9	13,2	91,15
p	0,8715		0,0000		0,0000		

Legenda: PRÉ – grupo inoculado no período pré-cirúrgico, PÓS - grupo inoculado no período pós-cirúrgico, PRÉ E PÓS - grupo inoculado nos períodos pré e pós-cirúrgicos, C – grupo controle, SF – soro fisiológico, LPS – lipopolissacarídeo, DP – desvio padrão, P – significância estatística obtida pelo método de T-student.

Apêndice 15
PORCENTAGEM DE BASTONETES (%)

Ratos	PRÉ		PÓS		PRÉ E PÓS		C
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	
1	0	3	0	11	0	33	0
2	0	0	0	21	0	28	0
3	0	0	0	9	0	25	1
4	1	1	0	16	1	19	0
5	0	2	0	8	0	26	2
6	0	1	0	22	0	33	1
7	1	0	1	19	2	28	1
8	0	0	0	15	0	36	0
9	0	0	0	18	0	24	3
10	2	0	0	26	0	18	0
Média	0,4	0,7	0,1	16,5	0,3	27	0,8
DP	0,70	1,06	0,32	5,87	0,67	5,91	1,14
p	0,4645		0,0000		0,0000		

LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉCIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS - GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS – LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

Apêndice 16
BILIRRUBINA TOTAL (mg/dl)

Ratos	PRÉ		PÓS		PRÉ-PÓS		C
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	
1	1,22	0,61	0,85	1,71	1,61	2,71	0,87
2	1,14	0,52	0,54	2,56	1,54	3,53	0,62
3	0,45	0,93	0,78	1,06	0,48	2,06	0,55
4	0,56	0,66	1,46	1,93	1,36	1,93	1,63
5	0,45	1,35	0,83	1,72	1,23	1,72	0,54
6	0,17	0,64	0,95	1,89	1,12	3,89	1,36
7	0,64	1,38	1,67	1,17	1,48	2,17	0,41
8	1,51	0,93	0,54	2,14	0,85	4,04	0,65
9	0,82	0,82	0,23	2,37	0,72	2,27	0,84
10	1,13	1,21	0,66	1,83	0,52	1,73	0,93
Média	0,81	0,91	0,85	1,84	1,09	2,61	0,84
DP	0,43	0,31	0,43	0,47	0,42	0,89	0,39
p	0,5733		0,0001		0,0001		

LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉCIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS - GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS – LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

Apêndice 17

TGO (u/L)

Ratos	PRÉ		PÓS		PRÉ-PÓS		C
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	
1	121	95	132	132	161	232	65
2	85	82	121	125	123	224	87
3	96	135	114	128	83	301	136
4	54	94	97	169	75	271	201
5	61	122	133	132	126	198	63
6	176	131	111	153	68	314	87
7	91	94	85	213	83	186	87
8	174	84	131	188	71	291	58
9	165	73	124	175	108	133	81
10	94	139	94	256	86	324	149
Média	111,70	104,90	114,20	167,10	98,40	247,40	101,40
Dp	45,39	24,40	17,20	42,79	30,24	63,00	46,07
p	0,6814		0,0019		0,0000		

LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉCIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS - GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS – LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

Apêndice 18

TGP (u/L)

Ratos	PRÉ		PÓS		PRÉ-PÓS		C
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	
1	44,3	46,2	39,8	32,2	43,7	93,5	42,8
2	45,9	55,1	41,7	66,1	43,4	101,3	43,7
3	51,2	50,6	40,2	55,6	50,1	66,1	39,2
4	47,9	46,3	47,9	49,3	47,2	114,2	41,9
5	36,8	47,8	41,7	58,1	37,6	86,6	51,7
6	45,3	54,2	37,9	67,2	44,1	91,1	57,9
7	29,8	29,1	41,9	63	36,8	101,6	22,9
8	48,9	47,2	55,9	63,2	48,1	93,1	55,9
9	53,1	52,2	36,1	65,1	54,3	113,3	37,1
10	33,4	34,3	29,9	64,2	38,6	74,1	29,9
Média	43,80	46,30	41,90	58,40	44,32	93,50	42,31
Dp	8,36	9,97	12,43	17,27	6,74	11,48	6,52
p	0,4753		0,0005		0,0000		

LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉCIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS - GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS – LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

Apêndice 19
TEMPO DE AÇÃO DA PROTROMBINA (TAP) (segundos)

Ratos	PRÉ		PÓS		PRÉ E PÓS		C
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	
1	15,5	13,2	14,5	18,2	16,4	19,3	14,4
2	15,3	14,4	13,4	15,5	14,2	28,4	15,1
3	15,4	15,2	15,6	16,4	16,4	27,1	15,9
4	15,2	15,3	16,8	19,1	16,8	28,2	15,4
5	16,7	14,6	18,7	23,3	18,7	17,3	14,3
6	16,1	15,9	13,1	17,6	13,1	19,6	16,2
7	15,9	16,8	14,6	22	14,9	26,9	14,7
8	15,7	15,4	14,7	19,5	16,7	29,2	15,9
9	15,4	14,1	16,4	23,8	16,4	28,4	14,8
10	15,8	16,3	15,6	26,6	15,8	25,1	16,3
Média	15,79	15,12	15,36	20,20	15,98	24,99	15,39
DP	0,39	1,08	1,65	3,59	1,51	4,19	0,61
p	0,0810		0,0011		0,0000		

LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS - GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS – LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

Apêndice 20
URÉIA (mg/dl)

Ratos	PRÉ		PÓS		PRÉ-PÓS		C
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	
1	54	87,22	65	134,67	36	287,04	45
2	67	109,24	41	155,55	54	253,63	42
3	32	164,51	75	147,412	32	122,46	54
4	48	129,15	36	163,21	51	213,31	35
5	42	117,43	29	192,75	48	316,98	62
6	55	66,46	54	126,33	50	239,52	54
7	63	87,24	39	95,69	63	365,17	32
8	71	122,91	41	173,98	52	151,79	49
9	31	137,82	52	266,44	36	192,52	48
10	28	106,37	37	93,91	62	123,33	52
Média	49,10	112,84	46,90	154,99	48,40	226,58	47,30
Dp	15,52	28,28	14,39	50,35	10,69	81,90	9,13
p	0,0000		0,0000		0,0000		

LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS - GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS – LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

Apêndice 21
CREATININA (mg/dl)

Ratos	PRÉ		PÓS		PRÉ-PÓS		C
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	
1	0,35	0,65	0,29	1,53	0,51	1,25	0,39
2	0,72	1,52	0,45	1,66	0,36	1,37	0,52
3	0,34	0,89	0,36	1,25	0,41	1,68	0,75
4	0,76	0,87	0,62	2,44	0,65	2,94	0,36
5	0,26	0,66	0,29	1,12	0,32	1,85	0,29
6	0,63	1,43	0,36	1,51	0,47	1,47	0,36
7	0,24	0,94	0,48	2,84	0,36	2,65	0,47
8	0,49	0,45	0,55	2,71	0,29	3,55	0,36
9	0,55	0,74	0,36	2,41	0,47	2,21	0,29
10	0,31	0,56	0,28	1,21	0,54	3,56	0,51
Média	0,47	0,87	0,40	1,87	0,44	2,25	0,43
Dp	0,19	0,35	0,12	0,66	0,11	0,88	0,14
p	0,0050		0,0000		0,0000		

Legenda: PRÉ – grupo inoculado no período pré-cirúrgico, PÓS - grupo inoculado no período pós-cirúrgico, PRÉ E PÓS - grupo inoculado nos períodos pré e pós-cirúrgicos, C – grupo controle, SF – soro fisiológico, LPS – lipopolissacarídeo, DP – desvio padrão, p – significância estatística obtida pelo método de T-Student.

Apêndice 22
ENDOTOXINA (uE/ml)

Ratos	PRÉ		PÓS		PRÉ-PÓS		C
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	
1	0	0,039	0	0,156	0	0,039	0
2	0	0	0	0,156	0	0,156	0
3	0	0	0	0,039	0	0,156	0
4	0	0	0	0,156	0	0,039	0
5	0	0	0	0,039	0	0,039	0
6	0	0	0	0,039	0	0,156	0
7	0	0	0	0,039	0	0,156	0
8	0	0,039	0	0,039	0	0,156	0
9	0	0	0	0,039	0	0,156	0
10	0	0	0	0,039	0	0,039	0
Média	0	0,0078	0	0,0741	0	0,1092	0
Dp	0	0,016444	0	0,056516	0	0,060419	0

LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS - GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS – LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

Apêndice 23
DOSAGENS DE FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (picogramas/ml)

Ratos	PRÉ		PÓS		PRÉ-PÓS		C
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	
1	12	18	6	16	0	1380	3,01
2	8	11	2,5	23	1,25	656	2,98
3	5,7	8	3,78	22	4,16	532	5,12
4	6,9	14	5,3	26	2,1	764	3,27
5	4	7	0	39	1,36	1255	4,84
6	3,8	6,6	2,65	14	0	921	0
7	0	8,2	4,1	9,3	6,3	718	5,22
8	5,7	8	0	16	0	743	6,14
9	0	6	0	8,7	1,25	974	3,62
10	0	12	1,2	21	4,6	1452	5,01
MX	4,61	9,88	2,55	19,50	2,10	939,50	3,95
DP	3,92	3,84	2,23	8,94	2,19	320,19	2,75
p	0,0071		0,0000		0,0000		

Legenda: PRÉ – grupo inoculado no período pré-cirúrgico, PÓS - grupo inoculado no período pós-cirúrgico, PRÉ E PÓS - grupo inoculado nos períodos pré e pós-cirúrgicos, C – grupo controle, SF – soro fisiológico, LPS – lipopolissacarídeo, DP – desvio padrão, p – significância estatística obtida pelo método de T-Student.

Apêndice 24
DOSAGENS DE HIDROXIPROLINA TECIDUAL (microgramas de hidroxiprolina/miligrama de proteína)

Ratos	PRÉ		PÓS		PRÉ-PÓS		C
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	
1	0,987	0,835	0,656	0,238	0,867	0,263	0,954
2	0,965	0,564	0,644	0,525	0,758	0,192	1,023
3	0,841	0,497	0,871	0,411	0,445	0,155	0,832
4	0,621	0,789	0,888	0,142	0,614	0,314	0,745
5	1,294	0,675	1,517	0,253	1,089	0,248	0,782
6	0,364	0,856	0,722	0,326	0,743	0,181	0,841
7	1,225	1,063	0,533	0,524	0,862	0,112	0,688
8	0,651	1,282	0,766	0,121	1,951	0,243	0,852
9	0,646	0,641	1,183	0,221	0,571	0,183	1,324
10	0,987	0,95	0,111	0,411	0,621	0,252	0,654
MX	0,86	0,82	0,79	0,32	0,85	0,21	0,87
DP	0,29	0,24	0,38	0,15	0,43	0,06	0,20
p	0,7224		0,0016		0,0002		

LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉCIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS - GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS – LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

Apêndice 25

HISTOMETRIA COMPUTADORIZADA PARA COLÁGENOS MADURO E IMATURO (%)

Ratos	TIPO I MADURO						C	TIPO III IMATURO						C
	PRÉ		PÓS		PRÉ-PÓS			PRÉ		PÓS		PRÉ-PÓS		
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS		SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	
1	86	68	77	48	82	38	83	12	28	32	51	18	62	17
2	74	64	82	65	75	42	74	21	31	14	33	25	58	26
3	75	47	64	45	64	29	69	26	49	37	49	36	71	31
4	83	76	75	38	69	18	55	15	22	22	62	31	82	45
5	75	66	71	69	82	27	92	19	29	28	29	18	73	8
6	83	82	82	59	83	45	74	11	15	15	33	17	55	26
7	82	57	74	69	76	52	83	16	44	26	28	24	48	17
8	84	68	75	58	74	59	76	14	29	24	40	26	41	24
9	79	33	79	34	78	57	84	18	55	18	65	22	43	16
10	78	79	82	66	72	66	88	19	19	14	32	28	34	12
Mx	79,9	64	76,1	55,1	75,5	43,3	77,8	17,1	32,1	23	42,2	24,5	56,7	22,2
DP	4,3	15,0	5,7	13,0	6,1	15,5	10,7	4,5	13,1	7,9	13,7	6,1	15,5	10,7
p	0,0047		0,0002		0,0000			0,0031		0,0012		0,0000		

LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS - GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS – LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

Apêndice 26
PORCENTAGEM DE POSITIVIDADE DO ANTÍGENO DE PROLIFERAÇÃO NUCLEAR

Ratos	PRÉ		PÓS		PRÉ-PÓS		C
	SF	LPS	SF	LPS	SF	LPS	
1	91	74	86	68	82	52	95
2	84	75	98	64	85	48	74
3	86	72	94	71	96	61	89
4	79	81	78	84	81	42	82
5	94	83	86	61	83	47	94
6	84	79	85	67	88	41	77
7	81	78	79	62	90	38	83
8	84	71	92	63	87	45	94
9	84	73	89	67	83	41	86
10	79	89	91	74	88	64	93
MX	84,60	77,50	87,80	68,10	86,30	47,90	86,70
DP	4,81	5,66	6,32	6,90	4,52	8,72	7,54
p	0,0073		0,0000		0,0000		

LEGENDA: PRÉ – GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PRÉ-CIRÚRGICO, PÓS - GRUPO INOCULADO NO PERÍODO PÓS-CIRÚRGICO, PRÉ E PÓS - GRUPO INOCULADO NOS PERÍODOS PRÉ E PÓS-CIRÚRGICOS, C – GRUPO CONTROLE, SF – SORO FISIOLÓGICO, LPS – LIPOPOLISSACARÍDEO, DP – DESVIO PADRÃO, P – SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA OBTIDA PELO MÉTODO DE T-STUDENT.

Apêndice 27

AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS PESAGENS EM TO

ONE-WAY ANALYSIS OF VARIANCE (ANOVA)

THE P VALUE IS 0.9873, CONSIDERED NOT SIGNIFICANT.

VARIATION AMONG COLUMN MEANS IS NOT SIGNIFICANTLY GREATER THAN EXPECTED BY CHANCE.

POST TESTS

POST TESTS WERE NOT CALCULATED BECAUSE THE P VALUE WAS GREATER THAN 0.05.

ASSUMPTION TEST: ARE THE STANDARD DEVIATIONS OF THE GROUPS EQUAL?

ANOVA ASSUMES THAT THE DATA ARE SAMPLED FROM POPULATIONS WITH IDENTICAL SDS. THIS ASSUMPTION IS TESTED USING THE METHOD OF BARTLETT.

BARTLETT STATISTIC (CORRECTED) = 2.972

THE P VALUE IS 0.3959.

BARTLETT'S TEST SUGGESTS THAT THE DIFFERENCES AMONG THE SDS IS NOT SIGNIFICANT.

ASSUMPTION TEST: ARE THE DATA SAMPLED FROM GAUSSIAN DISTRIBUTIONS?

ANOVA ASSUMES THAT THE DATA ARE SAMPLED FROM POPULATIONS THAT FOLLOW GAUSSIAN DISTRIBUTIONS. THIS ASSUMPTION IS TESTED USING THE METHOD KOLMOGOROV AND SMIRNOV:

GROUP	KS	P VALUE	PASSED NORMALITY TEST?
=====	=====	=====	=====
C	0.1284	>0.10	YES
SF PRÉ	0.2127	>0.10	YES
SF PÓS	0.1688	>0.10	YES
SF PRÉ-PÓS	0.1498	>0.10	YES

INTERMEDIATE CALCULATIONS. ANOVA TABLE

SOURCE OF VARIATION	DEGREES OF FREEDOM	SUM OF SQUARES	MEAN SQUARE
=====	=====	=====	=====
TREATMENTS (BETWEEN COLUMNS)	3	14.371	4.790
RESIDUALS (WITHIN COLUMNS)	36	3868.2	107.45
-----	-----	-----	-----
TOTAL	39	3882.6	

$$F = 0.04458 = (MSTREATMENT / MSRESIDUAL)$$

SUMMARY OF DATA

GROUP	NUMBER OF POINTS	MEAN	STANDARD DEVIATION	STANDARD ERROR OF MEAN	MEDIAN
=====	=====	=====	=====	=====	=====
C	10	142.60	7.763	2.455	142.50
SF PRÉ	10	143.29	12.917	4.085	144.35
SF PÓS	10	143.00	11.450	3.621	141.00
SF PRÉ-PÓS	10	141.70	8.460	2.675	142.00

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM	95% CONFIDENCE INTERVAL FROM	INTERVAL TO
=====	=====	=====	=====	=====
C	132.00	156.00	137.05	148.15
SF PRÉ	123.20	168.10	134.05	152.53
SF PÓS	129.00	167.00	134.81	151.19
SF PRÉ-PÓS	129.00	154.00	135.65	147.75

Apêndice 28

AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS PESAGENS EM T7

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.5909, considered not significant.

Variation among column means is not significantly greater than expected by chance.

Post tests

Post tests were not calculated because the P value was greater than 0.05.

Assumption test: Are the standard deviations of the groups equal?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations with identical SDs. This assumption is tested using the method of Bartlett.

Bartlett statistic (corrected) = 2.974

The P value is 0.3957.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is not significant.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
=====	=====	=====	=====
C	0.1896	>0.10	Yes
SF PRÉ	0.1982	>0.10	Yes
SF PÓS	0.2315	>0.10	Yes
SF PRÉ-PÓS	0.1623	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
=====	=====	=====	=====
Treatments (between columns)	3	212.28	70.761
Residuals (within columns)	36	3946.9	109.64
-----	-----	-----	-----
Total	39	4159.2	

$F = 0.6454 = (MS_{\text{treatment}} / MS_{\text{residual}})$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
=====	=====	=====	=====	=====	=====
C	10	172.72	7.923	2.505	170.30
SF PRÉ	10	167.16	13.164	4.163	168.40
SF PÓS	10	171.93	11.418	3.611	171.40
SF PRÉ-PÓS	10	168.56	8.491	2.685	168.90

Group	Minimum	Maximum	95% Confidence Interval From	95% Confidence Interval To
=====	=====	=====	=====	=====
C	162.80	186.80	167.05	178.39
SF PRÉ	146.50	191.60	157.74	176.58
SF PÓS	157.90	193.90	163.76	180.10
SF PRÉ-PÓS	155.90	180.90	162.49	174.63

Apêndice 29

AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA DAS PESAGENS EM T14

ONE-WAY ANALYSIS OF VARIANCE (ANOVA)

THE P VALUE IS 0.9523, CONSIDERED NOT SIGNIFICANT.

VARIATION AMONG COLUMN MEANS IS NOT SIGNIFICANTLY GREATER THAN EXPECTED BY CHANCE.

POST TESTS

POST TESTS WERE NOT CALCULATED BECAUSE THE P VALUE WAS GREATER THAN 0.05.

ASSUMPTION TEST: ARE THE STANDARD DEVIATIONS OF THE GROUPS EQUAL?

ANOVA ASSUMES THAT THE DATA ARE SAMPLED FROM POPULATIONS WITH IDENTICAL SDS. THIS ASSUMPTION IS TESTED USING THE METHOD OF BARTLETT.

BARTLETT STATISTIC (CORRECTED) = 0.8252

THE P VALUE IS 0.8434.

BARTLETT'S TEST SUGGESTS THAT THE DIFFERENCES AMONG THE SDS IS NOT SIGNIFICANT.

ASSUMPTION TEST: ARE THE DATA SAMPLED FROM GAUSSIAN DISTRIBUTIONS?

ANOVA ASSUMES THAT THE DATA ARE SAMPLED FROM POPULATIONS THAT FOLLOW GAUSSIAN DISTRIBUTIONS. THIS ASSUMPTION IS TESTED USING THE METHOD KOLMOGOROV AND SMIRNOV:

GROUP	KS	P VALUE	PASSED NORMALITY TEST?
=====	=====	=====	=====
C	0.1937	>0.10	YES
SF PRÉ	0.2195	>0.10	YES
SF PÓS	0.1860	>0.10	YES
SF PRÉ-PÓS	0.1735	>0.10	YES

INTERMEDIATE CALCULATIONS. ANOVA TABLE

SOURCE OF VARIATION	DEGREES OF FREEDOM	SUM OF SQUARES	MEAN SQUARE
=====	=====	=====	=====
TREATMENTS (BETWEEN COLUMNS)	3	63.990	21.330
RESIDUALS (WITHIN COLUMNS)	36	6829.6	189.71
-----	-----	-----	-----
TOTAL	39	6893.6	

$F = 0.1124 = (MSTREATMENT/MSRESIDUAL)$

SUMMARY OF DATA

GROUP	NUMBER OF POINTS	MEAN	STANDARD DEVIATION	STANDARD ERROR OF MEAN	MEDIAN
=====	=====	=====	=====	=====	=====
C	10	198.10	11.850	3.747	196.70
SF PRÉ	10	196.27	13.464	4.258	198.65
SF PÓS	10	197.49	16.058	5.078	192.85
SF PRÉ-PÓS	10	199.78	13.389	4.234	200.00

GROUP	MINIMUM	MAXIMUM	95% CONFIDENCE INTERVAL FROM	INTERVAL TO
=====	=====	=====	=====	=====
C	183.10	221.70	189.62	206.58
SF PRÉ	173.90	212.40	186.64	205.90
SF PÓS	178.50	226.20	186.00	208.98
SF PRÉ-PÓS	183.20	227.20	190.20	209.36