

Sergio Ricardo Penteado Filho

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM LACTULOSE
E REPOSIÇÃO DE SAIS BILIARES NAS
CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DE FATOR DE
NECROSE TUMORAL α E LIPOPOLISSACARÍDEO
BACTERIANO EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS À
OBSTRUÇÃO BILIAR EXTRA-HEPÁTICA.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências
da Saúde da Universidade Federal do Paraná como
requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Domingues Replka
Coordenador: Prof. Dr. José Gastão Rocha de Carvalho

**Curitiba
2003**

Penteado Filho, Sérgio Ricardo

Influência do tratamento com lactulose e reposição de sais biliares nas concentrações séricas de fator de necrose tumoral α e lipopolissacarídeo bacteriano em ratos Wistar submetidos à obstrução biliar extra-hepática.

viii, f.32

Orientador : Dr. João Carlos Domingues Repka

Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná

1. obstrução biliar; 2. lipopolissacarídeo, 3. Fator de necrose tumoral α ; 4. ratos Wistar; Tumoral Necrosis Factor α .



Ministério da Educação
Universidade Federal do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna
= Mestrado e Doutorado =

PARECER

PARECER CONJUNTO dos Professores **Dr. João Eduardo Nicoluzzi**, **Dr. Nemer Hajar** e **Dr. João Carlos Domingues Repka** sobre a Dissertação de Mestrado em Medicina Interna da Universidade Federal do Paraná, elaborado por **Sérgio Ricardo Penteado Filho**, intitulada: **Influência do Tratamento com Lactulose e Reposição de Sais Biliares na Concentração Sérica de Fator de Necrose Tumoral α e Lipopolissacarídeo Bacteriano em Ratos Wistar Submetidos a Obstrução Biliar Extra-Hepática**". A Banca Examinadora considerou que **Sérgio Ricardo Penteado Filho** apresentou trabalho adequado para Dissertação de Mestrado e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas, atribuindo-lhe: **Conceito "A"**, correspondente ao **Grau "10"**, sendo pois unanimemente recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **MESTRE**, conferido pelo **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA INTERNA - MESTRADO** e a publicação da Dissertação em veículo de divulgação conveniente, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições.

Curitiba, 27 de março de 2.003.


Prof. Dr. João Eduardo Nicoluzzi


Prof. Dr. Nemer Hajar


Prof. Dr. João Carlos Domingues Repka

Agradecimentos

Consigno aqui, cumprindo um dever gratíssimo, os agradecimentos àqueles que me auxiliaram na formação médica, pessoal e na execução deste estudo:

Aos Mestres

Professora Dr^a Ailema Lory Luvison Franck
Professor Dr. Coriolano Caldas Silveira da Motta
Professora Dr^a Thelma Larocca Skare
Professora Dr^a Virgínia Helena dos Santos
Professor Dr. Nelson Mosachi
Professor Dr. José Carlos Bacelar Junior
Professor Dr. Joachin Graff
Professor Dr. Rogério Molinari
Professor Dr. José Gastão Rocha de Carvalho
Professor Dr. João Gualberto de Sá Sheffer
Professor Dr. Jacyr Pasternak

À Faculdade Evangélica do Paraná

Ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade Evangélica do Paraná e aos seus funcionários

Ao programa de pós-graduação em Medicina Interna do Setor de Ciências de Saúde da Universidade Federal do Paraná

Aos meus pais Sergio e Leila

À minha esposa Patrícia

Ao meu amigo e mestre Professor Dr. João Carlos Domingues Repka

Sumário

1.	Introdução	1
1.1.	Objetivos	3
2.	Revisão da Literatura	4
3.	Material e Método	11
3.1.	Amostra estudada	11
3.2.	Delineamento experimental	11
3.3.	Procedimento cirúrgico para ligadura de ducto biliar em ratos	12
3.4.	Tratamento e reposição	12
3.4.1	Tratamento com Lactulose	12
3.4.2	Reposição de Sais Biliares	12
3.5.	Coleta de Amostras	13
3.5.1	Coleta de Sangue	13
3.6.	Procedimentos Laboratoriais	13
3.6.1	Dosagem de Bilirrubina	13
3.6.2	Dosagem de Endotoxina	13
3.6.3	Dosagem de Fator de Necrose Tumoral α	16
3.7.	Avaliação Estatística	18
4.	Resultados	19
4.1.	Grupo Normal	19
4.2.	Grupo Controle	20
4.3.	Grupo Lactulose	21
4.4.	Grupo Sais Biliares	22
4.5.	Dosagens de Endotoxinas	23
4.6.	Dosagens de TNF α	24
5.	Discussão	25
6.	Conclusões	30
	Referências Bibliográficas	31

Lista de Abreviaturas

LPS	Lipopolisacarídeo
KDO	Ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosônico
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
TNF β	Fator de necrose tumoral beta
IL-3	Interleucina 3
NK	Natural killer cells
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
MHC	Major histocompatibility complex
g	Grama
(N)	Grupo normal
(L)	Grupo lactulose
(SB)	Grupo sais biliares
(C)	Grupo controle - soro fisiológico
mg	Miligrama
Kg	Kilograma
cm	Centímetros
ml	Mililitros
mm	Milímetros
rpm	Rotações por minuto
°C	Graus Celsius
LAL	Lisado de amebócitos de <i>Limulus</i> sp
UE	Unidade endotóxica
UE/ml	Unidades endotóxicas por mililitro
μ l	Microlitros
N	Normal
pH	Potencial hidrogeniônico
pg/ml	Picogramas por mililitro
nm	Nanômetro
ND	Não detectado
DP	Desvio padrão
M	Média
p	Níveis de significância

Lista de Tabelas

Tabela: 01	Demonstrativo dos grupos, número de animais, objetivo de cada grupo e procedimentos executados	11
Tabela: 02	Demonstrativo da preparação das diluições do padrão de endotoxinas	15
Tabela: 03	Relação entre densidade óptica e concentração do padrão de TNF α de rato (pg/ml)	18
Tabela: 04	Resultados das determinações de endotoxinas, TNF α e Bilirubinas no Grupo Normal (N)	19
Tabela 05	Resultado do Grupo Controle (C).....	20
Tabela 06	Níveis de significância (p) entre as dosagens de endotoxina, TNF α , bilirubina entre os ratos dos grupos C e N	20
Tabela 07	Demonstrativo dos valores individuais, média e desvio padrão das dosagens de endotoxina, TNF α e bilirubina dos ratos do grupo Lactulose (L)	21
Tabela 08	Níveis de significância (p) entre as dosagens de endotoxina, TNF α , bilirubina entre os ratos dos grupos C e L	21
Tabela 09	Demonstrativo dos valores individuais, média e desvio padrão das dosagens de endotoxina, TNF α e bilirubina dos ratos do grupo SB	22
Tabela 10	Níveis de significância (p) entre as dosagens de endotoxina, TNF α , bilirubina entre os ratos dos grupos C e SB	22
Tabela 11	Níveis de significância (p) entre as dosagens de endotoxina, TNF α e bilirubina entre os ratos dos grupos SB e L	23

Listas de Gráficos

Gráfico 1	Curva de Calibração de Endotoxina Padrão	15
Gráfico 2	Curva de Calibração das diluições do Padrão de TNF α	18
Gráfico 3	Dosagem de Endotoxinas (UE/ml), nos quatro grupos N (controle-normal), C (ligadura de ducto biliar – soro fisiológico), L (ligadura de ducto biliar e tratamento com lactulose), SB (ligadura de ducto biliar e tratamento com sais biliares)	23
Gráfico 4	Dosagem de TNF α (pg/ml), nos quatro grupos N (controle-normal), C (ligadura de ducto biliar – soro fisiológico), L (ligadura de ducto biliar e tratamento com lactulose), SB (ligadura de ducto biliar e tratamento com sais biliares)	24

Resumo

O objetivo deste estudo foi verificar a influência da administração de lactulose e sais biliares nos níveis séricos de $\text{TNF}\alpha$ e LPS em um modelo experimental de obstrução biliar extra-hepática. Para este propósito foram utilizados 35 ratos Wistar machos com peso de $216,12 \pm 9,56\text{g}$. Foram separados em quatro grupos : Controle (N) com 5 ratos, nos quais nenhum procedimento foi executado e três grupos experimentais com dez ratos cada, submetidos à ligadura do ducto biliar comum e tratados diariamente, por quatro dias com lactulose (grupo L), sais biliares (grupo SB) e solução salina isotônica (grupo C – simulação). Os níveis séricos de $\text{TNF}\alpha$, LPS e bilirubinas foram dosados no quarto dia de evolução. Os resultados obtidos foram : controle (N): $\text{TNF}\alpha$: indetectável, LPS: indetectável, bilirubina total: $0,406 \pm 0,074$ mg/ml, simulação (C): $\text{TNF}\alpha$: $1.298 \pm 245,72$ pg/ml, LPS: $0,207 \pm 0,028$ UE/ml bilirubinas: $1,92 \pm 0,332$ mg/ml, Lactulose (L): $\text{TNF}\alpha$: $1.308 \pm 289,519$ pg/ml, LPS: $0,1134 \pm 0,059$ UE/ml, bilirubina: $2,035 \pm 0,263$ mg/ml, Sais biliares (SB): $\text{TNF}\alpha$: $1.054 \pm 141,624$ pg/ml, LPS: $0,188 \pm 0,023$ UE/ml, bilirubinas: $1,948 \pm 0,221$ mg/ml. Níveis elevados de $\text{TNF}\alpha$, LPS e bilirubinas foram detectados em todos os ratos submetidos à obstrução do ducto biliar comum. Os níveis de LPS foram significativamente mais baixos no grupo lactulose ($p < 0,05$). Não houve variação significativa dos níveis de $\text{TNF}\alpha$ e LPS no grupo grupo SB quando comparados com o grupo C. Concluiu-se que a oclusão biliar extra-hepática induziu níveis séricos elevados de LPS e $\text{TNF}\alpha$ em ratos e o tratamento com lactulose reduziu os níveis de LPS mas não os de $\text{TNF}\alpha$. O tratamento com sais biliares não influenciou nos níveis séricos de LPS e $\text{TNF}\alpha$.

Abstract

The aim to this study was to verify the presence of circulating TNF α and LPS in extra-hepatic biliary obstruction animal model and evaluate the influence of lactulose treatment and bile salts replacement in TNF α and LPS circulation levels. For this purpose 35 male Wistar rats weighing $216,12 \pm 9,56g$. were used. They were divided in four groups: control (N) (5 rats) in which no procedures were executed and 3 experimental groups with 10 rats each, with ligated common bile ducts and treated with Lactulose daily doses (L group), bile salts daily doses (BS group) and isotonic saline solution daily doses (Sham - S group). The serum TNF α , LPS and bilirubins were determined in day 4. The values obtained were: Control(N): TNF α : undetectable, LPS: undetectable, bilirubin: $0,406 \pm 0,074mg/ml$, Sham(S): TNF α : $1298 \pm 245,72pg/ml$, LPS: $0,207 \pm 0,028UE/ml$ bilirubin: $1,92 \pm 0,332mg/ml$, Lactulose (L): TNF α : $1.308 \pm 289,519pg/ml$, LPS: $0,1134 \pm 0,059UE/ml$, bilirubin: $2,035 \pm 0,263mg/ml$, Bile Salt(BS): TNF α : $1.054 \pm 141,624pg/ml$, LPS: $0,188 \pm 0,023 UE/ml$, bilirubin: $1,948 \pm 0,221mg/ml$. Significant levels of TNF α , LPS and bilirubins were detected in all rats submitted to biliar obstruction. The LPS level was significantly lower in lactulose group ($p < 0.05$). There were no significant variations of TNF α and LPS levels on SB group when compared with S group. We concluded that the extra-hepatic biliar occlusion was efficient in inducing LPS and TNF α in rats and the treatment with lactulose reduced the LPS circulating level but not the TNF α levels. The biliary salts treatment did not influence the release of TNF α and LPS.

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

A sepse e o choque séptico são situações clínicas de extrema gravidade que mesmo com as mais avançadas técnicas de tratamento em terapia intensiva, acarretam mortalidade em 30 a 60 % dos casos.

Os estudos que objetivavam definir sua fisiopatogenia focaram inicialmente a interação do agente infeccioso ao hospedeiro com especial atenção nos fatores de virulência e nas deficiências imunitárias do hospedeiro, realmente, estes fatores explicam a evolução insatisfatória em alguns casos, contudo, são insuficientes para explicar todo o espectro de apresentações clínicas e evoluções observadas.

Recentemente, a demonstração de que os mecanismos de coagulação e inflamação atuam em conjunto com o sistema imune, levou a uma nova concepção fisiopatológica da sepse, quando foram valorizados os eventos inflamatórios endoteliais.

Certamente estes fenômenos objetivam auxiliar o sistema imune no combate a infecção através do aumento da permeabilidade capilar, vasoconstrição e trombose venular e vasodilatação arterial, além disso, estes eventos alternam-se objetivando preservar o fluxo sanguíneo e minimizar as lesões tissulares isquêmicas, mantendo circunscrito o processo infeccioso e facilitando os mecanismos de reparação.

Embora esta seqüência de eventos seja extremamente eficiente, uma vez ocorrendo falha e disseminação sistêmica do agente infeccioso, este poderá alojar-se em diversos órgãos, na macro e microcirculação, desencadeando coagulação e fibrinólise e alterações vasomotoras. A seguir inicia-se intenso processo inflamatório, desequilíbrio hemodinâmico e em última instância, disfunção orgânica múltipla, incompatível com a vida.

Clinicamente estes fenômenos traduzem-se em choque séptico caracterizado por diminuição da resistência vascular periférica e aumento do débito cardíaco. O sistema nervoso autônomo na tentativa de otimizar o fluxo sanguíneo periférico libera grandes quantidades de catecolaminas levando a um aumento de fluxo sanguíneo para as extremidades e circulação cardiopulmonar-cerebral e diminuindo o fluxo esplâncnico. Este processo associado à elevada

concentração sérica de proteínas pró-inflamatórias leva à perda dos mecanismos de defesa do trato gastrointestinal, permitindo a passagem de bactérias e de seus subprodutos da luz do tubo digestivo para a corrente sangüínea, processo este conhecido como translocação bacteriana, sobrepondo nova seqüência de eventos infecciosos e inflamatórios.

A descoberta de que o principal fator bacteriano desencadeador de resposta inflamatória sistêmica é um lipopolissacarídeo (LPS), encontrado na parede celular das bactérias Gram negativas, levou à formulação da hipótese de que em se obtendo manutenção de fluxo sangüíneo esplâncnico, preservação da integridade morfofuncional do tubo digestivo e manutenção da capacidade fagocítica do fígado ocorreria diminuição da translocação bacteriana e de LPS o que poderia influenciar favoravelmente na evolução dos pacientes sépticos.

Neste contexto têm sido propostas as seguintes estratégias: Nutrição enteral e parenteral suplementada com glutamina, drogas hepato-protetoras como N-acetilcisteína, expansão plasmática agressiva, diálise por membranas ou resinas filtrantes de LPS, anticorpos monoclonais anti-LPS e atuação direta no tubo digestivo com drogas que dificultem o crescimento bacteriano ou a diminuição de LPS intraluminal. Estas estratégias, embora cientificamente fundamentadas, quando transpostas de modelos animais para ensaios clínicos apresentaram resultados controversos.

Sem dúvida a melhor compreensão da interação e regulação dos eventos pró e antiinflamatórios, cascata de coagulação, mecanismos imunológicos e biologia dos agentes infecciosos serão necessários para possibilitar desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais efetivas e reprodutíveis.

Estudos com modelos animais que visam auxiliar na compreensão deste complexo processo, despertam o interesse de pesquisadores das áreas básicas e clínicas; sendo este o escopo deste estudo.

Objetivos:

- Evidenciar em modelo de obstrução biliar extra-hepática a liberação de Fator de Necrose Tumoral α e endotoxina bacteriana circulantes;
 - Verificar a influência de sais biliares e tratamento com lactulona nos níveis de de Fator de Necrose Tumoral α e endotoxina bacteriana circulantes.
-

2. REVISÃO DA LITERATURA

2. Revisão da literatura

No final do século XIX, numerosos bacteriologistas haviam identificado e estudado o papel biológico de substâncias danosas ao organismo, que eram excretadas ativamente por diversas bactérias. Essas substâncias, denominadas exotoxinas, tinham como ponto em comum, a inativação pelo aquecimento. Nesse período descobriu-se que algumas substâncias liberadas pela lise de bactérias eram resistentes ao calor e se mostravam capazes de produzir efeitos biológicos importantes como febre e choque circulatório. Diferentes autores as denominaram endotoxina e pirotoxina, estas foram posteriormente identificadas como uma só substância originária da membrana celular de bactérias Gram-negativas.¹

Na primeira metade do século XX, o rápido aperfeiçoamento das técnicas bioquímicas mostrou que esta toxina era composta por açúcares polimerizados e complexos de ácidos graxos e proteínas. Tendo sido demonstrado que a porção protéica não tinha significado patológico, o termo LPS passou a ser de uso corrente e sinônimo de endotoxina, abandonando-se as demais terminologias, que definiam mal o seu comportamento bioquímico. Hoje sabe-se que a estrutura básica da endotoxina é dependente de sua origem, estando relacionada ao desencadeamento de processos fisiopatológicos básicos no choque séptico³².

A inoculação de quantidades variáveis de LPS, é capaz de induzir efeitos adversos que vão de simples calafrios, até o choque e a morte de animais sob experimentação. As moléculas de endotoxinas formam uma rígida armadura, protegendo as bactérias Gram-negativas dos efeitos adversos do meio exterior e também da ação de antibióticos. Por outro lado, existem evidências de que o LPS cumpre função protetora no hospedeiro, pela estimulação do sistema imunológico na resistência contra infecções bacterianas, virais e câncer¹⁰.

A complexidade da estrutura química do LPS consumiu 25 anos de pesquisa de numerosos cientistas. Sua porção lipídica conhecida como lipídeo A, encontra-se na membrana externa da bactéria, sendo seu principal componente, outra porção, um polissacarídeo, projeta-se para o meio extra-celular e divide-se em duas partes, uma mais interna ligada diretamente ao lipídeo A chamada "core" e outra mais externa chamada cadeia O-específica. O

oligossacarídeo que constitui o "core" encontra-se por sua vez dividido em uma porção mais externa, com pouca variabilidade estrutural e pouco significado fisiopatológico, e outra mais interna ligada ao lipídeo A, com características especiais. Esta porção interna contém dois açúcares de ocorrência incomum. Uma heptose, que faz a ligação da parte externa do "core" com a molécula de KDO (ácido 3-deoxi-D-mano-2-octulosônico) que por sua vez, liga-se à porção lipídica.

O KDO é constituinte obrigatório de todos os lipopolissacarídeos estudados e não é encontrado em nenhuma célula animal. A cadeia O-específica, é constituída por 20 a 40 unidades monoméricas de até 8 açúcares que se mostram extremamente variáveis entre as espécies e subtipos bacterianos. Esta porção do LPS induz formação de anticorpos específicos capazes de reconhecer somente esta parte da molécula^{28,34}.

Em termos fisiopatológicos o lipídeo A é a porção mais importante do LPS. É a porção com menor variação estrutural e responsável por todos os efeitos maléficos ou benéficos descritos até hoje. O lipídeo A é constituído principalmente de glucosamina e fosfato, associados a um ácido graxo que contém 14 átomos de carbono. A liberação do lipídeo A, separando-se da parede bacteriana, é necessária para que a molécula se torne ativa, fenômeno que ocorre somente quando as bactérias morrem ou se dividem.

Como as bactérias podem habitar o interior ou o exterior das células de um hospedeiro, o lipídeo A liberado no espaço intracelular, precisa ser exteriorizado para que se obtenha algum efeito.

A capacidade dos subcomponentes do lipídeo A em produzir choque séptico se mostrou inferior à da molécula inteira. Derivados sintéticos também se mostraram menos potentes que a molécula natural, demonstrando que uma configuração estrutural, ainda não definida, é necessária para maior interação com as células do hospedeiro. Estudando a resposta de diversas células à endotoxina, constatou-se que os macrófagos são os elementos celulares mais ativados³⁴. Possuem em sua superfície os receptores CD-14, capazes de se ligarem ao complexo formado por proteínas carregadoras e endotoxina, existindo também receptores para a endotoxina livre. Ativando estes receptores, um sinalizador interno induz a síntese de diversas substâncias capazes

de reproduzir todos os achados do choque séptico e também ações benéficas ligadas à defesa contra infecções^{25,44}.

O extraordinário avanço na técnica de clonagem molecular trouxe importantes conseqüências para a Medicina, permitindo a compreensão da fisiopatologia molecular da sepse, com detalhamento nunca antes imaginado. Nos últimos 10 anos, conseguiu-se identificar moléculas importantes, suas estruturas químicas, receptores de membranas, mecanismos de regulação e sua participação temporal em diversos eventos patológicos. Um panorama geral do mecanismo indireto pelo qual atuam produtos bacterianos, surgiu através de estudos com uma variedade de camundongo conhecida como C3H/HeJ³⁶. Como resultado de mutações genéticas espontâneas, estes animais não mostram nenhuma reatividade ao LPS. Demonstrou-se que o transplante de medula utilizando doadores normais compatíveis, tomavam estes animais suscetíveis aos efeitos letais do LPS. Por outro lado, a utilização de doadores C3H/HeJ na reconstituição da medula de camundongos normais, produzia animais quiméricos que não respondiam ao LPS. Desta forma, ficou claro que o LPS age de forma indireta, mediado por células hematopoiéticas^{37,53,55}. Adicionalmente pode-se demonstrar que sua produção é expressada por um só gene da bactéria, o gene LPS. Outros trabalhos mostram que esta molécula é, por si só, pouco tóxica, necessitando de mediadores endógenos para produzir a totalidade dos eventos observados durante o choque séptico^{39,27}.

A inoculação de endotoxina em primatas não anestesiados, é prontamente seguida de hipotensão arterial, com alterações da freqüência e do débito cardíaco, e decréscimo da resistência vascular periférica. Ocorre redução do retorno venoso, fato que condiciona a diminuição do débito cardíaco, observando-se estagnação sangüínea nas vênulas de todo o organismo. Ao contrário do que se registra no cão, nos primatas a estagnação do sangue em toda a rede vascular é uniforme, não se instalando exclusivamente no sistema hepato-esplâncnico⁵⁷. Progredindo o estado de choque acentua-se a dilatação arterial e capilar, com persistência da constrição das vênulas no cão. O sangue penetra na rede capilar em grande quantidade, encontrando dificuldade para fluir, em virtude da constrição venosa, o que gera aumento da pressão hidrostática. Como conseqüência, ocorre passagem de plasma e elementos figurados para o espaço

extra-vascular o que reduz volemia e perfusão tecidual^{45,53}. Segue anóxia e acidose, com conseqüente necrose hemorrágica da mucosa intestinal, diminuição do retorno venoso ao coração o que intensifica a redução do débito cardíaco e da pressão arterial. Já nos primatas as alterações circulatórias observadas na fase tardia do choque endotóxico são diferentes das registradas na fase inicial. Nesta, a resistência vascular periférica encontra-se aumentada, estando diminuído o débito cardíaco, apesar disso não se verifica nenhuma estagnação localizada.

As alterações hemodinâmicas conseqüentes ao choque endotóxico na espécie humana, assemelham-se às observadas nos primatas. Inicialmente ocorre diminuição da pressão arterial sistêmica, que se deve à diminuição da resistência arterial periférica, acompanhada por aumento do tônus venoso. A resistência arterial periférica encontra-se diminuída em todos os órgãos, exceto no baço, sugerindo a ocorrência de comprometimento difuso da microcirculação na fase inicial do choque endotóxico^{6,15,44}.

Recentemente, passa a figurar entre as causas de choque endotóxico, a oclusão de vias biliares extra-hepáticas, privando o tubo intestinal e o bolo fecal de sais biliares, os quais ficam retidos e disseminados no parênquima hepático, com conseqüente alteração da função desta víscera^{3,9,12,27}.

Neste contexto, são descritas alterações do sistema reticuloendotelial, efeito citotóxico nas células epiteliais do ducto biliar, falência da ativação macrofágica e aumento da população bacteriana Gram-negativa na flora fecal intraluminal. A endotoxemia é induzida pela disseminação de componentes lipopolissacarídeos do revestimento destas bactérias^{4,7,16,17,30}. As repercussões da endotoxemia têm sido alvo de intensas especulações, especialmente no que se refere à ativação de citocinas pró-inflamatórias e ocorrência de Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica⁵³.

O LPS das bactérias Gram-negativas é fator de sensibilização, pois a inoculação desta substância em voluntários ou animais, induz quadro clínico similar ao induzido durante a infecção por aquele tipo de bactéria¹⁰.

Em estado infeccioso, o organismo agredido entra em contato com o LPS não só no local de infecção, mas também sistemicamente devido ao envio para a corrente sangüínea de fragmentos de membranas bacterianas

carreadoras de LPS, liberadas por ocasião do crescimento e multiplicação bacteriana. Caso esta invasão sangüínea se torne maciça, há maior probabilidade de evolução para resposta exagerada de defesa por parte do organismo agredido.

Este fenômeno ocorre não só nas infecções descontroladas, como também com o uso de antibióticos em infecções graves, os quais, ao provocar lise bacteriana maciça, liberam subitamente uma quantidade significativa de endotoxina.

Uma vez estabelecido o contato inicial entre as células de defesa e a endotoxina, inicia-se a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos ($\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-8). Dentre estas citocinas, a mais precocemente produzida é o fator de necrose tumoral α , cuja liberação induzirá a síntese de diversas outras citocinas²⁸.

Também precoce, é a liberação de interleucina-1 (IL-1), que em conjunto com o TNF, é capaz de reproduzir inteiramente o quadro clínico de sepse em humanos e animais. As citocinas pró-inflamatórias interagem de forma a constituir um ciclo vicioso no seu próprio processo de indução, síntese e liberação. Embora estas substâncias sejam essenciais para a constituição de uma resposta de defesa adequada, não havendo um controle efetivo de sua produção, elas provocarão um estado de auto-agressão ao hospedeiro, originando numa fase posterior, os sinais e sintomas do choque séptico^{1,36,46}.

Finalmente, em fase mais avançada, a reação em cadeia já se encontra amplificada. As citocinas previamente liberadas, desencadeiam a ativação das cascatas intrínseca e extrínseca da coagulação, ativação do sistema fibrinolítico, ativação do complemento, geração de opióides endógenos, síntese de produtos da fosfolipase A2, incluindo fator de ativação plaquetária, leucotrienos e prostaglandinas, ativação do sistema das cininas, ativação de neutrófilos e células endoteliais, geração de radicais livres de oxigênio, ativação da sintetase de óxido nítrico e indução de hormônios de stress^{35,42,44}. Devido à ação destas substâncias o hospedeiro é então direta e difusamente atingido, justificando-se desta forma a instalação posterior de disfunção de múltiplos órgãos⁴⁰.

O $\text{TNF}\alpha$ é o principal mediador da resposta do hospedeiro frente a bactérias Gram-negativas e outros agentes infecciosos¹. A presença de um

efeito necrotizante de tumores coincidindo com infecção, foi primeiramente notada por Coley a 100 anos atrás, em um paciente com sarcoma na região cervical, a partir de então, suspensões de bactérias Gram-negativas esterilizadas pelo calor, denominadas toxinas de Coley, foram usadas como agentes anti-tumorais, no início do século.

Vários autores descreveram ser o TNF sintetizado sob duas formas: o TNF α e o TNF β também conhecido como linfotoxina, com 35% de homologia entre as moléculas e ligando-se ao mesmo receptor. Porém, o TNF α e a linfotoxina apresentam pequenas diferenças de ação biológica e são sintetizados por diferentes células²⁸. O TNF α é produzido por vários tipos de células mas sua maior fonte biológica são os macrófagos ativado por LPS e outros fatores como Micoplasmas, fatores imunológicos como a IL1, IL3 e Interferon γ , que age aumentando a atividade e a síntese de receptores, fazendo com que baixas concentrações de TNF α , tenham atividade biológica máxima, diminuindo seus efeitos tóxicos. Pode também ser produzido por células NK, mastócitos ativado e células T ativadas^{1,28,32}.

Em baixas concentrações, observa-se que o TNF α tem efeitos parácrinos e autócrinos, enquanto em altas concentrações apresenta efeitos endócrinos e leva à injúria tecidual. Sabe-se hoje que o mecanismo de injúria tecidual estudado por Schwartzman, que se atribui à ação do LPS (CIDV e necrose tumoral) é, na verdade, causado por TNF α ^{30,35}. Age sinergicamente à IL1 sobre o sistema imune, porém podemos assinalar as seguintes diferenças: Inibe a hematopoiese, podendo levar à linfopenia. Induz eosinofilia e ativação de células NK. Em endotélio, leva à necrose hemorrágica e coagulação intravascular disseminada. Diminui a contratilidade e perfusão tecidual miocárdica, provavelmente devido à indução da enzima sintetase do óxido nítrico. Aumenta a síntese de moléculas do MHC, ocasiona lise direta de células tumorais, caquexia e morte como efeitos tóxicos¹.

Os modelos experimentais de ligadura de ducto biliar comum de ratos têm demonstrado a ocorrência de endotoxemia conseqüente ao aumento da população bacteriana intestinal. Dentre os fatores limitadores de crescimento bacteriano intraluminal encontram-se os sais biliares, na carência

destes elementos, ocorre hipercolonização bacteriana⁴. A liberação de LPS da parede bacteriana é um processo natural durante a divisão e morte das espécies Gram-negativas^{8,13}. Assim sendo, existe correspondência entre hiperpopulação bacteriana intestinal e liberação de LPS o qual será imediatamente drenado para as circulações sanguínea e linfática. Proporcional à quantidade de LPS circulante³⁶, ocorrerão também liberações de citocinas pró-inflamatórias, especialmente o TNF α , e outros eventos conseqüentes como a translocação bacteriana^{16,17,18}.

Animais submetidos à ligadura de ducto biliar e tratados durante 14 dias com lactulose via oral, apresentam diminuição do crescimento bacteriano e conseqüentemente da endotoxemia, reduzindo a incidência de translocação bacteriana²⁹. Da mesma forma, a administração de componentes de sais biliares reduz a endotoxemia, promovendo o transporte de LPS pelos hepatócitos do sangue para a bile; logo, a excreção de LPS do conteúdo fecal é dependente de sais biliares^{27,54}. O choque endotóxico pode ser evitado por ação dos ácidos biliares uma vez que a absorção da endotoxina é feita pelos vasos da circulação intestinal, com intermediação de sais biliares^{6,52} e a privação de sais biliares ao intestino produz efeito deletério à integridade de sua mucosa⁴³.

3. MATERIAL E MÉTODO

3. Material e método

3.1. Amostra Estudada

Este estudo foi realizado em 35 ratos machos, albinos da linhagem Wistar, heterogênicos, com média de peso $216,12 \pm 9,56$ g. Foram distribuídos em quatro grupos, grupo controle (N) com cinco ratos normais, e três grupos com dez ratos que foram submetidos à laparotomia e ligadura de ducto biliar e separados conforme tratamento a serem submetidos. O grupo L recebeu lactulose, o grupo SB, sais biliares e o grupo C foi tratado com soro fisiológico.

3.2. Delineamento Experimental

Este estudo foi desenvolvido no período de quatro dias, teve como critério de avaliação a comparação estatística entre as variáveis: dosagem de endotoxinas, dosagem de fator de necrose tumoral α (TNF α) em grupos de animais submetidos à ligadura do ducto biliar tratados com lactulona ou sais biliares frente a um grupo não tratado.

Também foi executada a dosagem de bilirrubinas totais para evidenciar o estado de interrupção de fluxo biliar. Foram adotados os Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal¹⁴.

Tabela 01 : Demonstrativo dos grupos, número de animais, objetivo de cada grupo e procedimentos executados:

Grupo	Número de Animais	Objetivo e Procedimentos
N	05	Obter intervalos de variações de referências das variáveis do estudo: endotoxina, TNF α , bilirrubina. Os animais deste grupo não foram submetidos a nenhuma forma de manipulação.
C	10	Obter intervalos de variações das variáveis do estudo nos animais submetidos à laparotomia, ligadura de ducto biliar e tratamento com soro fisiológico.
L	10	Obter intervalos de variações das variáveis do estudo nos animais submetidos à laparotomia, ligadura de ducto biliar e tratamento com lactulose.
SB	10	Obter intervalos de variações das variáveis do estudo nos animais submetidos à laparotomia, ligadura de ducto biliar e tratamento com sais biliares.

3.3. Procedimento cirúrgico para ligadura do ducto biliar de ratos

Os ratos foram submetidos à anestesia por inoculação intra-peritoneal de Hidrato de Cloral a 10%, na dose de 500mg/kg de peso corpóreo e tricotomia ampla do abdômen. Em seguida foram colocados em decúbito dorsal e realizou-se anti-sepsia com polivinil-pirrolidona-iodo.

Para a laparotomia foi feita incisão mediana xifo-púbica, com abertura de todos os planos da parede abdominal e exposição da cavidade abdominal. Localizou-se o estômago e progredindo-se distalmente chegou-se ao duodeno onde está o ducto biliar. Realizou-se a ligadura do ducto com fio de algodão 3.0, tomando-se a precaução de não lesionar o pedículo hepático.

A síntese da ferida cirúrgica foi feita com sutura contínua em dois planos com fio Vicryl[®] 4-0 (Ethicon). Após o procedimento, os animais foram mantidos sob aquecimento de lâmpada elétrica até a recuperação da anestesia.

3.4. Tratamento e reposição

Para os tratamentos, foram utilizadas sondas metálicas de 10cm de comprimento com ponta romba, acopladas a uma seringa descartável de 3ml. Os animais foram anestesiados por inalação de éter sulfúrico e a sonda foi introduzida até o estômago.

3.4.1. Tratamento com Lactulose

Foi utilizado Lactulona[®] Luitpold, na dose de 2ml (1,3g/dia) a cada 24 horas⁴⁵.

3.4.2. Reposição de Sais Biliares

Empregou-se solução de sais biliares (Bile Salts[®] Difco artigo 0129-02-4) com concentração de 20%, na dose de 2ml a cada 12 horas (4g/dia)³⁸.

3.5. Coleta de Amostras

3.5.1. Coleta de Sangue

No quarto dia do experimento os animais foram anestesiados por inalação de éter sulfúrico e submetidos à punção intra-cardíaca com agulha 25x8 mm e seringa de 10 ml heparinizada. O volume de sangue coletado era imediatamente centrifugado por 10 minutos à 5.000rpm em centrífuga refrigerada a 5°C (Bio Research®), em tubos de centrífuga despirogenizados. O plasma foi separado com pipetas despirogenizadas e armazenado a -20°C, em frascos de vidro também despirogenizados.

3.6 Procedimentos Laboratoriais

3.6.1. Dosagem de Bilirrubina

Foram executadas pelo sistema automatizado COBAS-MIRA com reativos específicos.

3.6.2. Dosagem de Endotoxina

1. Princípio do Método

Para a dosagem de endotoxinas, foi empregado o método do Lymulus Amebocyte Lisate (Endosafe® 1073), que tem por princípio a capacidade dos amebócitos extraídos do crustáceo *Limulus polyphemus* gelificarem-se em presença de endotoxinas (LPS). Esta gelificação é consequência da ativação da enzima zimogênica serim-protease em presença de cátions divalentes que produzem o coagulogênio do *Limulus*⁶

2. Material

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

3. Método

3.1 Preparação de materiais despirogenados

- Acondicionar as pipetas e os frascos de vidro com papel alumínio e colocá-los em forno Pasteur à temperatura de 180°C por 3 horas.

3.2 Preparação do reagente LAL(Lisado de Amebócitos de *Limulus* sp.)

- Reconstituir o lisado com água apirogênica (água recém-destilada) com o volume indicado pelo fabricante do reagente.
- Homogeneizar evitando a formação de espuma
- Aliquotar com pipeta automática, 0,1ml do reagente LAL em tubos de hemólise
- Conservar os tubos em freezer a -20°C.

3.3 Preparação da Endotoxina Padrão

- Reconstituir o liofilizado de endotoxina padrão, com água e materiais despirogenados, conforme as orientações do fabricante. O padrão de endotoxina deverá conter 50UE/ml.
-

3.4 Preparação da Curva Padrão de Endotoxina

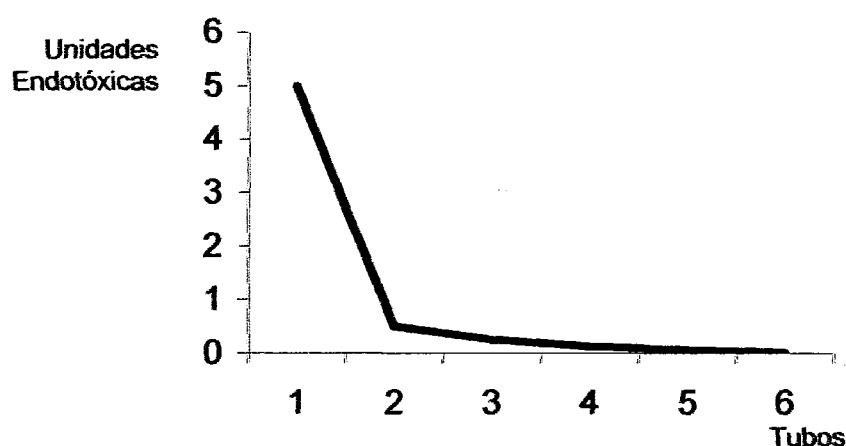
Preparar diluições do padrão de endotoxina conforme tabela abaixo :

Tabela 02: Demonstrativo da preparação das diluições do padrão de endotoxina

<i>Tubo</i>	<i>Volume a ser transferido (ml)</i>	<i>Volume de Água Apirogênica (ml)</i>	<i>Unidade Endotóxicas (UE/ml)</i>
1	0,5ml de endotoxina padrão (50 UE/ml)	4,5ml	5,00
2	0,5ml do tubo 1	0,5ml	0,50
3	0,5ml do tubo 2	0,5ml	0,25
4	0,5ml do tubo 3	0,5ml	0,125
5	0,5ml do tubo 4	0,5ml	0,06
6	0,5ml do tubo 5	0,5ml	0,03

A cada diluição realizada, agitar em vortex durante 5 minutos.

Gráfico 1 : Curva de Calibração de Endotoxina Padrão



- Distribuir 0,1ml de cada uma das diluições nos tubos com o reagente LAL.
- Incubar por 1 hora em banho-Maria 37°C
- Não agitar os tubos
- Proceder à leitura por inversão dos tubos a 180°
- Resultado positivo é indicado pela formação de gel que não se desprende do fundo do tubo.
- A sensibilidade do reagente LAL, será a última diluição com reação de gelificação positiva.

3.5 Análise qualitativa de endotoxina nas amostras de plasma de ratos

- Distribuir 0,1ml da amostra em tubo contendo o reagente LAL.
- Realizar a prova com controle positivo (endotoxina padrão 5 UE/ml) e controle negativo (água apirogênica)
- Incubar a 37°C por 1 hora
- Realizar a leitura
- Se a amostra produzir reação de gelificação, proceder à análise quantitativa, conforme descrito abaixo.

3.6 Análise quantitativa de endotoxina nas amostras de plasma de ratos

- Realizar diluições seriadas com fator 2 de diluição 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16.
- Distribuir 0,1ml de cada diluição em tubos contendo 0,1ml do reagente LAL.
- Incubar a 37°C por 1 hora.
- Realizar a leitura.
- Se a amostra produzir reação de gelificação, proceder ao cálculo de teor de endotoxina em Unidades Endotóxicas/ml (EU/ml), multiplicando a sensibilidade do reagente LAL pela última diluição que produziu reação de gelificação.

3.6.3. Dosagem de Fator de Necrose Tumoral α

1. Princípio do Método

Esta dosagem emprega a técnica imunoenzimática quantitativa, na qual um anticorpo monoclonal específico anti-TNF α é fixado em placa de Terazaki. Foi empregado o conjunto de reativos BIOTRA – Tumor Necrosis Factor ELISA System (Amersham Pharmacia code RPN 2718). As amostras são distribuídas em cada um dos orifícios da placa num volume de 50 μ l, incubadas e submetidas à revelação com anticorpos monoclonais anti-TNF α conjugados com peroxidase os quais reagindo com peróxido de hidrogênio, irão desenvolver cor mensurável em espectrofotômetro a 450nm de comprimento de onda. O desenvolvimento da cor indica a presença do TNF α na amostra, que será proporcionalmente maior quanto for a intensidade da leitura espectrofotométrica⁴⁶.

2. Materiais:

- 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.

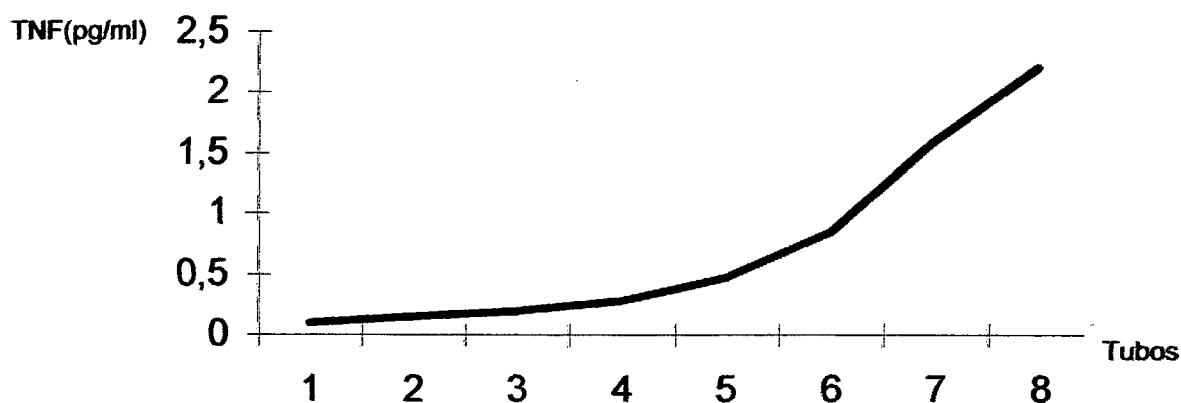
3. Método:

- Distribuir 50 μ l da amostra em cada orifício da placa de Terazaki.
- Distribuir 50 μ l de cada diluição do TNF 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 pH 7,5.
- 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 pH 7,5.
- Distribuir 20 μ l de peróxido de hidrogênio a 30%, em cada um dos orifícios.
- Distribuir 10 μ l de Ortofenilenediamino (50 mg em 25ml de tampão Citrato pH 5,0) 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.
- Interpolar as leituras dos padrões de TNF de rato às leituras das amostras.
- Calcular por regressão linear a quantidade de TNF presente nas amostras em picogramas/ml.

Tabela 3: Relação entre densidade óptica e concentração do padrão de TNF de rato (pg/ml)

Concentração do Padrão de TNF α de rato (pg/ml)	Tubo	Densidade Óptica a 450nm
Solução Tampão Fosfatos pH7,5	1	0,100
43	2	0,149
86	3	0,199
172	4	0,277
344	5	0,466
688	6	0,841
1.376	7	1,598
2.752	8	2,203

Legenda: TNF α = Fator de Necrose tumoral α , pg/ml = picogramas por mililitro

Gráfico 2: Curva de Calibração das diluições do Padrão de TNF α 

3.7. Avaliações Estatísticas

Para a comparação entre as médias e desvios padrões das variáveis avaliadas entre os grupos de animais estudados, empregou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando 5% como nível de significância.

4. RESULTADOS

4. Resultados

Todos os animais dos grupos que sofreram obstrução de vias biliares demonstraram icterícia, alças intestinais gaseificadas e distendidas.

Apresentavam comportamento similar ao grupo N no que se refere à capacidade de deambulação, acesso à alimentação e água, contudo, verificou-se eriçamento de pelos e blefarite em todos, com exceção dos animais do grupo N.

4.1. Resultados do Grupo Normal (N)

Este grupo com 5 ratos foi constituído para determinar os valores médios das variáveis avaliadas e compará-las com a literatura. Assim sendo, foram encontrados valores de referência para a dosagem de bilirrubina, as quais encontram-se em acordo aos valores obtidos neste grupo ($0,406 \pm 0,074$ mg/ml).

Níveis de endotoxinas e LPS séricos não foram detectados.

Tabela 04 : Resultados das determinações de endotoxinas, TNF α e bilirrubinas no grupo normal (N)

Rato Número	Endotoxinas (UE/ml)	TNF (pg/ml)	Bilirrubina (mg/ml)
1	ND	ND	0,32
2	ND	ND	0,45
3	ND	ND	0,38
4	ND	ND	0,37
5	ND	ND	0,51
Média			0,406
Desvio Padrão	não se aplica	não se aplica	0,074

Legenda: UE = Unidades Endotóxicas, pg= Picogramas, ND = valores não detectado

4.2. Resultados do Grupo Controle (C)

No grupo C foram encontrados os seguintes valores médios das variáveis estudadas: Endotoxinas $0,207 \pm 0,028$ EU/ml, TNF $1.298 \pm 245,72$ pg/ml, Bilirrubinas $1,921 \pm 0,332$ mg/ml.

Tabela 05: Resultado do Grupo Controle (C)

Rato Número	Endotoxinas (UE/ml)	TNF (pg/ml)	Bilirrubina (mg/ml)
1	0,212	1.182	1,65
2	0,213	1.058	2,16
3	0,196	1.100	2,30
4	0,210	1.261	1,34
5	0,183	1.037	2,41
6	0,176	1.522	1,87
7	0,215	1.733	1,94
8	0,280	1.146	1,86
9	0,193	1.324	1,76
Média	0,207	1.298	1,921
Desvio Padrão	0,028	245,72	0,332

Legenda: UE = Unidades Endotóxicas, pg= Picogramas

Quando comparados os valores médios do grupo C (tabela 05) aos do grupo N (tabela 04), verificam-se diferenças estatisticamente significantes para todas as variáveis analisadas, demonstrando que o procedimento de ligadura do ducto biliar dos ratos induziu elevação significativa dos níveis de bilirrubinas bem como promoveu liberação de endotoxina e TNF.

Neste grupo ocorreu óbito de um rato devido a falha em técnica cirúrgica não sendo este dado analisável do ponto de vista estatístico

Tabela 06: Níveis de significância (p) entre as dosagens de endotoxina, TNF, bilirrubina entre os ratos dos grupos C e N

Grupos		Endotoxinas (UE/ml)	TNF (pg/ml)	Bilirrubina (mg/ml)
C	M	0,207	1.298	1,921
	DP	0,028	245,720	0,332
N	M	Valores não detectados		0,406
	DP			0,074
p				<0,05

Legenda: EU/ml = Unidades Endotóxicas por mililitro, pg/ml= Picogramas por mililitro, mg/ml= miligrama por mililitro, M = Média DP = Desvio padrão

4.3. Grupo Lactulose (L)

No Grupo L foram encontrados os seguintes valores médios dos parâmetros analisados: Endotoxinas $0,1134 \pm 0,059$ EU/ml, TNF $1.308 \pm 289,519$, Bilirrubinas $2,035 \pm 0,263$ mg/ml.

Tabela 07: Demonstrativo dos valores individuais, média e desvio padrão das dosagens de endotoxina, TNF e bilirrubina dos ratos do grupo Lactulose (L)

Ratos	Endotoxinas (UE/ml)	TNF (pg/ml)	Bilirrubina (mg/ml)
1	0,173	1.740	1,71
2	0,091	1.380	2,53
3	0,082	1.275	2,06
4	0,184	1.275	1,93
5	0,071	963	1,72
6	0,083	841	1,89
7	0,078	1.732	2,17
8	0,153	1.366	2,04
9	0,199	1.385	2,27
10	0,020	1.123	1,73
Média	0,113	1.308	2,035
Desvio Padrão	0,059	289,519	0,263

Legenda: EU/ml = Unidades Endotóxicas por mililitro, pg/ml= Picogramas por mililitro, mg/ml= miligrama por mililitro

Ao serem comparados os valores obtidos nos ratos do Grupo L (tabela 07) aos do Grupo C (tabela 05), verificam-se diferenças estatisticamente significativas entre as dosagens de endotoxina, não sendo significante as diferenças entre as dosagens de TNF α e bilirrubinas.

Tabela 08: Níveis de significância (p) entre as dosagens de endotoxina, TNF, bilirrubina entre os ratos dos grupos C e L

Grupos		Endotoxinas (UE/ml)	TNF (pg/ml)	Bilirrubina (mg/ml)
L	M	0,1134	1.308	2,035
	DP	0,059	289,519	0,263
C	M	0,207	1.298	1,921
	DP	0,028	245,720	0,332
p		<0,05	>0,05	>0,05

Legenda: EU/ml = Unidades Endotóxicas por mililitro, pg/ml= Picogramas por mililitro, mg/ml= miligrama por mililitro, M = Média DP = Desvio padrão

4.4. Grupo Sais Biliares (SB)

No Grupo SB foram encontrados os seguintes valores médios dos parâmetros analisados: Endotoxinas $0,188 \pm 0,023$ EU/ml, $\text{TNF}\alpha$ $1.075 \pm 141,624$, Bilirrubinas $1,948 \pm 0,221$ mg/ml.

Tabela 09: Demonstrativo dos valores individuais, média e desvio padrão das dosagens de endotoxina, TNF e bilirrubina dos ratos do grupo tratado com sais biliares (SB)

Ratos	Endotoxinas (UE/ml)	TNF α (pg/ml)	Bilirrubina (mg/ml)
1	0,160	1.031	1,60
2	0,186	1.350	1,85
3	0,193	1.070	2,19
4	0,213	821	1,68
5	0,175	1.000	2,23
6	0,187	1.132	2,03
7	0,173	1.047	1,89
8	0,183	1.120	1,92
9	0,176	963	2,15
10	0,237	1.075	1,79
Média	0,188	1.054	1,948
Desvio Padrão	0,023	141,624	0,221

Legenda: EU/ml = Unidades Endotóxicas por mililitro, pg/ml= Picogramas por mililitro, mg/ml= miligrama por mililitro

Ao serem comparados os valores obtidos no grupo SB (tabela 09) aos do grupo C (tabela 05) não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre as dosagens de endotoxina ($p > 0,05$), $\text{TNF}\alpha$ ($p > 0,05$) e bilirrubina ($p > 0,05$).

Tabela 10: Níveis de significância (p) entre as dosagens de endotoxina, TNF α , bilirrubina entre os ratos dos grupos C e sais biliares SB

Grupos		Endotoxinas (UE/ml)	TNF α (pg/ml)	Bilirrubina (mg/ml)
C	M	0,207	1,298	1,921
	DP	0,028	245,72	0,332
SB	M	0,188	1,054	1,948
	DP	0,023	141,624	0,221
p		>0,05	>0,05	>0,05

Legenda: EU/ml = Unidades Endotóxicas por mililitro, pg/ml= Picogramas por mililitro, mg/ml= miligrama por mililitro, M = Média DP = Desvio padrão

Ao serem comparados os valores obtidos no Grupo SB (tabela 09) aos do Grupo L (tabela 07) verificam-se diferenças estatisticamente significativas entre as dosagens de endotoxina ($p < 0,05$), não sendo significativa as diferenças entre as dosagens de $TNF\alpha$ e bilirrubina ($p > 0,05$).

Tabela 11: Níveis de significância (p) entre as dosagens de endotoxina, TNF e bilirrubina entre os ratos dos grupos SB e L:

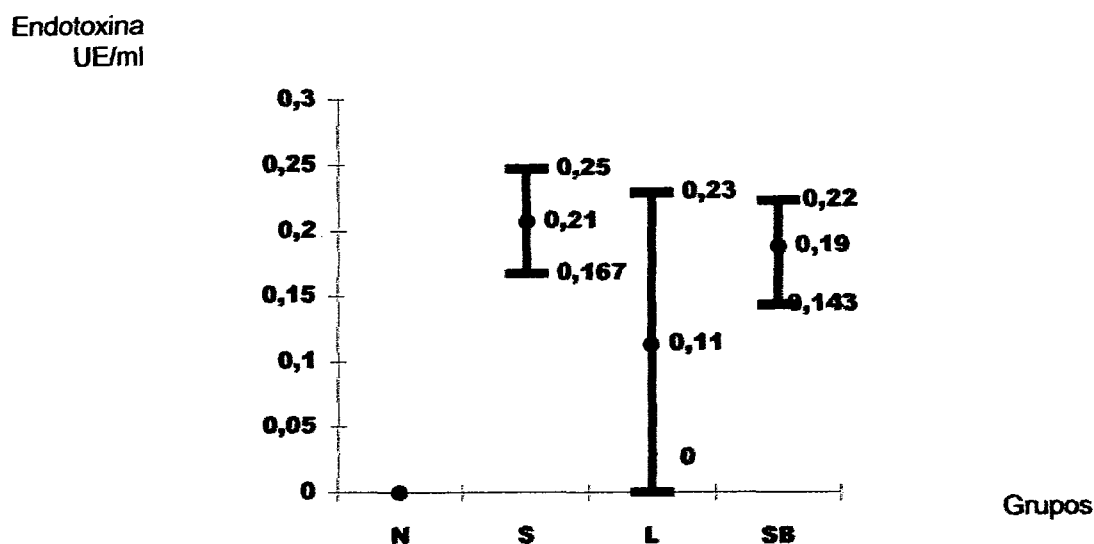
Grupos		Endotoxinas (UE/ml)	$TNF\alpha$ (pg/ml)	Bilirrubina (mg/ml)
L	M	0,113	1.308	2,035
	DP	0,059	289,519	0,263
SB	M	0,188	1.054	1,948
	DP	0,023	141,624	0,221
p		<0,05*	>0,05	>0,05

Legenda: EU/ml = Unidades Endotóxicas por mililitro, pg/ml = Picogramas por mililitro, mg/ml = miligrama por mililitro, M = Média DP = Desvio padrão

4.5. Dosagens de Endotoxinas:

Foram obtidos valores de endotoxinas estatisticamente significativos em todos os grupos experimentação sendo que os valores máximos, médios e mínimos de cada grupo foram: Grupo C (0,25, 0,21, 0,167 UE/ml), Grupo L (0,23, 0,11, 0 UE/ml), Grupo SB (0,22, 0,19, 0,143 UE/ml).

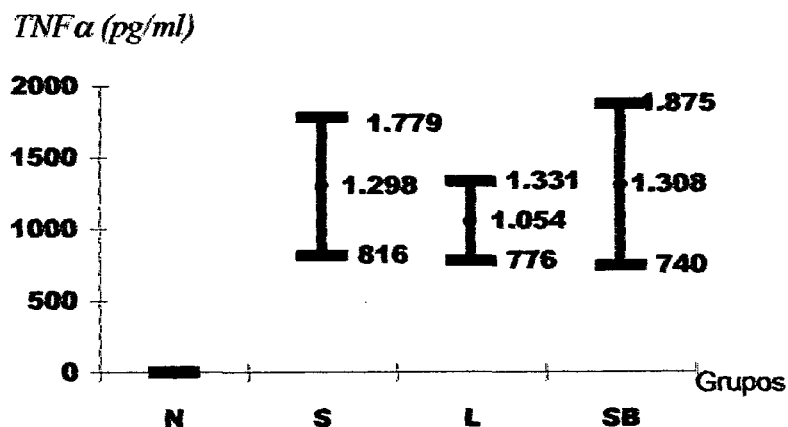
Gráfico 03 - Dosagem de Endotoxinas (UE/ml), nos quatro grupos N (controle-normal), C (ligadura de ducto biliar), L (ligadura de ducto biliar e tratamento com lactulose), SB (ligadura de ducto biliar e tratamento com sais biliares)



4.6 Dosagem de $TNF\alpha$:

Foram obtidos valores de $TNF\alpha$ estatisticamente significativos em todos os grupos experimentação sendo que os valores máximos, médios e mínimos de cada grupo foram: Grupo C (1.779, 1.298, 816 pg/ml), Grupo L (1.331, 1.054, 776 pg/ml), Grupo SB (1.875, 1.308, 740 pg/ml).

Gráfico 04 - Dosagem de $TNF\alpha$ (pg/ml), nos quatro grupos N (controle-normal), C (ligadura de ducto biliar), L (ligadura de ducto biliar e tratamento com lactulose), SB (ligadura de ducto biliar e tratamento com sais biliares)



5. DISCUSSÃO

5. Discussão

As situações clínicas onde ocorre obstrução da via biliar extra-hepática ou alterações do fluxo esplâncnico provocando disfunções parciais de excreção de sais biliares são freqüentes. Estes eventos estão associados à alta mortalidade, seja pela doença primária seja pela interferência na homeostasia vascular sistêmica e do trato gastrointestinal ou alterações na microbiota normal que favorecem ao fenômeno de translocação bacteriana.

Comprovadamente a oclusão biliar extra-hepática é indutora de aumento da população bacteriana intestinal, pois os sais biliares são limitadores do crescimento de Gram-negativos aeróbicos e anaeróbicos. Uma vez ocorrendo crescimento bacteriano exagerado intraluminal e conseqüente liberação de LPS, este é drenado pela rede linfática regional e, a seguir, estimula a produção de TNF α pelos macrófagos CD-14^{15, 27, 30}.

Os mecanismos envolvidos não são completamente esclarecidos, contudo, sabe-se que o aumento dos níveis de TNF α correlaciona-se ao fenômeno de translocação bacteriana^{11, 19, 38, 41}.

Estes eventos correlatos tomam importância no contexto da sepse e choque séptico onde o desequilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias, aumento da concentração sérica de subprodutos bacterianos com poder inflamatório e a perpetuação do processo infeccioso por bactérias endógenas contribuem para evolução desfavorável deste síndrome.

A melhor compreensão dos eventos gastrintestinais associados à disfunção hepática endócrina e exócrina pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que minimizem o impacto da agressão sistêmica provocada pelo fenômeno de translocação bacteriana e de seus subprodutos.

Neste estudo avaliou-se a influência do tratamento com lactulose e reposição de sais biliares, em modelo animal de oclusão biliar extra-hepática, nos níveis séricos de endotoxinas, TNF α , bilirubinas.

Observou-se endotoxemia significativa em todos os grupos submetidos à obstrução biliar (L, SB e C), quando comparados ao grupo N

comprovando a hipótese de que a interrupção do fluxo de bile leva ao desequilíbrio entre a quantidade de endotoxina que alcança o fígado e sua capacidade fagocítica.

Esta situação pode ocorrer por três situações distintas ou interrelacionadas, são elas: o déficit da excreção de sal biliar pode levar à hiperproliferação bacteriana intraluminal e por consequência, liberação de LPS em maior quantidade, o processo inflamatório sistêmico pode acarretar baixo fluxo esplâncnico ocasionando alterações entre as ligações intercelulares intestinais permitindo a passagem de LPS para a corrente sanguínea, o fenômeno de colestase desencadeia alterações na estrutura morfofuncional do fígado diminuindo sua capacidade de fagocitose e permitindo a passagem de LPS para a circulação sistêmica. Estas três hipóteses podem interrelacionar-se não sendo possível através deste estudo concluir qual é o evento preponderante, contudo levando-se em conta que alguns autores observaram diminuição da atividade fagocítica das células de Kupffer em vigência de oclusão de ducto biliar extra-hepático, hiperproliferação bacteriana quando da ausência de sais biliares intraluminais e o fenômeno de translocação bacteriana associado a estado de choque séptico ou hipovolêmico ou resposta inflamatória sistêmica, pode-se inferir embasado nos resultados obtidos neste modelo que a lactulona, através do seu poder laxante e regulador da hiperproliferação bacteriana, é capaz de minimizar a quantidade de endotoxina que alcança a circulação sistêmica provavelmente por efeito local, visto não haver absorção e concentração sistêmica do fármaco. Entretanto não se pode afirmar que este medicamento não exerça nenhuma função direta na capacidade fagocítica das células de Kupffer através de subprodutos farmacológicos formados dentro da luz intestinal que podem alcançar a circulação portal devido ao aumento de permeabilidade intestinal.

As dosagens de $\text{TNF}\alpha$ e os níveis de bilirrubinas diferiram significativamente nestes grupos em relação ao grupo N, o que comprova a validade do modelo para estudos de ativação do $\text{TNF}\alpha$ via LPS de bactérias endógenas.

Em estudos recentes a influência da icterícia obstrutiva tem sido implicada na gênese da endotoxemia^{27, 30, 40} e na diminuição funcional da barreira intestinal¹⁸.

O metabolismo hepático encontra-se igualmente alterado, quando a endotoxemia se faz também presente, tendo como efeito secundário, a diminuição do fluxo sangüíneo no tecido hepático causado pela icterícia obstrutiva^{12,57}. Além disso, foram observados comprometimento imunológico e distúrbios da barreira intestinal relacionados à translocação bacteriana conseqüentes à obstrução biliar e endotoxemia com perpetuação de quadro inflamatório em cães após 14 dias de obstrução biliar¹⁵. A administração intravenosa do ácido ursodeoxicólico protege contra a endotoxemia, premoendo o transporte de LPS pelos hepatócitos, do sangue para bile, sem afetar a função fagocítica das células de Kúpffer, o que explica a absorção do LPS ser dependente de sais biliares^{7,29}. Por outro lado a adição destes sais biliares na dieta de animais exacerbou lesões intestinais⁴⁵.

Achados contraditórios da literatura enfatizam a existência de lesões intestinais na ausência de níveis normais de bile. Este fato pode ser explicado pelo emprego de distintas fontes de bile em diferentes espécies animais. É sabido que sua composição difere de espécie para espécie⁴⁹.

A lactulose é um dissacarídeo formado por uma molécula de galactose e outra de frutose, denominada quimicamente como 4-O-β-D-galactopiranzil-D-frutofucose. Esta, uma vez ingerida, não é absorvida pelo trato gastrointestinal e tampouco é hidrolizável enzimaticamente, devido a ausência de enzima específica (lactulase). A lactulose chega ao cólon, praticamente inalterada, onde é fermentada pelas bactérias sacarolíticas produzindo ácido láctico e pequenas quantidades dos ácidos acético e fórmico, esta acidificação aumenta a pressão osmótica, causando afluxo de líquidos para o interior do cólon, resultando em aumento e liquefação do bolo fecal desta forma acelerando o trânsito intestinal^{29, 38}. No grupo de ratos sob oclusão biliar e tratado com 1,3 gramas de lactulose por dia durante 4 dias, houve endotoxemia significativamente ($p < 0.05$) menor que os animais do grupo C (não-tratados).

É provável que o efeito de esvaziamento intestinal provocado pela lactulose seja o responsável por uma diminuição de bactérias Gram-negativas da microbiota intestinal, ocasionando menor translocação bacteriana o que provavelmente esteja correlacionado com menores níveis de endotoxinas

circulantes quando comparados aos demais grupos, confirmando os resultados da literatura⁴⁴. Nos animais do grupo tratado com solução de sais biliares de procedência bovina na dose de 4g/dia, foi observada endotoxemia em níveis superiores ao grupo L. A dosagem de TNF α também foi significativamente superior ao grupo N, porém inferior ao grupo L.

A reposição de sais biliares por via oral tem sido indicada, em estudos experimentais de obstrução biliar, desde que se leve em conta a procedência da mesma. O mecanismo que justifica esta indicação refere-se à capacidade limitadora de crescimento bacteriano Gram-negativo intraluminal pela bile^{15,26}.

Ao serem confrontadas as médias e os níveis de significância dos grupos estudados observou-se que a oclusão biliar extra-hepática induziu endotoxemia (UE/ml) nos grupos C ($0,207\pm 0,028$), SB ($0,188\pm 0,023$) e L ($0,1134\pm 0,059$). O tratamento com sais biliares não demonstrou diferença na endotoxemia do grupo C em relação ao grupo SB. Uma explicação para estes achados é que neste estudo não foi utilizado sais biliares de ratos e sim sais biliares bovino que provavelmente não exercem efeito na microbiota murina. Desta forma sugere – se que o fenômeno de endotoxemia está relacionado com a hiperpopulação de espécimes bacterianas intestinais^{13,23}.

Cabe comentar que o fígado exerce papel importante na remoção sérica de substâncias provenientes do trato gastrointestinal em processo conhecido como "clearance hepático", disfunções estruturais ou funcionais do fígado, especialmente relacionadas às células de Kupffer podem influenciar nos níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias e fragmentos bacterianos. Evidentemente a capacidade de trabalho destas células, como em qualquer célula do organismo é limitada por fatores físico químicos sendo que condições adversas de circulação que acarretem menor oxigenação, menor transporte de nutrientes, alterações na remoção de catabólitos ou radicais livres podem levar a diminuição deste clearance. Podemos especular que estratégias que visem o controle da população bacteriana colônica reduzindo sua multiplicação seja por influência no ecossistema ou ação antibacteriana direta e terapêuticas que preservem a integridade morfofuncional dos enterócitos assim como a capacidade metabólica e

fagocítica hepática possam equacionar este problema reduzindo, pelo menos em parte, o problema acarretado pelo hipofluxo esplâncnico nos quadro de choque séptico.

6. CONCLUSÕES

A oclusão biliar extra-hepática induz endotoxemia e liberação de fator de necrose tumoral α .

O tratamento com lactulose diminuiu a concentração sérica de endotoxinas, entretanto não levou a diminuição da concentração sérica de $\text{TNF}\alpha$.

O tratamento com sais biliares não demonstrou efeito quanto à concentração sérica de endotoxinas e $\text{TNF}\alpha$.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Cytokines. In : _____. **Cellular and molecular immunology**. 2.ed. Philadelphia : W.B. Saunders, 1994. cap. 12, p.240-260.
2. ACCATINO, L.; FIGUEROA, C.; PIZARRO, M.; SOLIS, N. Enhanced biliary excretion of canalicular membrane enzymes in estrogen-induced and obstructive cholestasis, and effects of different bile acids in the isolated perfused rat liver. **J.Hepatol.**, Copenhagen, v.22, n.6, p.658-670, 1995.
3. ACKERMAN, Z.; KARMELI, F.; AMIR, G.; RACHMILEWITZ, D. Gastric and colonic inflammatory and vasoactive mediators in experimental portal hypertension. **Liver**, Copenhagen, v.16, n.1, p.12-18, 1996.
4. BATT, R.M.; RUTGERS, H.C.; SANCAK, A. A Enteric bacteria: friend or foe. **J. Small Anim. Pract.**, Oxford, v.37, n.6, p.261-267, 1996.
5. BENEDETTI, A.; ALVARO, D.; BASSOTTI, C.; GIGLIOZZI, A.; FERRETTI, G.; LA ROSA, T.; DI SARIO, A.; BAIOCHE, L.; JEZEQUEL, A.M. Cytotoxicity of bile salts against biliary epithelium: a study in isolated bile ductule fragments and isolated perfused rat liver. **Hepatology**, Philadelphia, v.26, n.1, p.9-21, 1997.
6. 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.
7. BLANCHARD, D.K.; DJEU, J.Y.; KLEIN, T.W.; FRIEDMAN, H.; STEWART, W.E. Interferon – gamma induction by lipopolisaccharyde : dependence on interleukin 2 and macrophages. **J. Immunol.**, Baltimore, v.136, n.3, p.963-970, 1986.
8. BOVEE OUDENHOVEN, I.M.; TERMONT, D.S.; WEERKAMP, A.H.; FAASSEN PETERS, M.A.; Van der MEER, R. Dietary calcium inhibits the intestinal colonization and translocation of Salmonella in rats. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.113, n.2, p.550-557, 1997.
9. BRINK, M. A.; MENDEZ-SANCHEZ, N.; CAREY, M.C. Bilirubin cycles enterohepatically after ileal resection in the rat. **Gastroenterology**, Philadelphia, v.110, n.6, p.1945-1957, 1996.
10. BROGDEN, K. A.; PHILLIPS, M. The ultrastructural morphology of endotoxins and lipopolysaccharides. **Electron. Microsc. Ver.**, v.1, n.2, p.261-278, 1988.
11. CHUANG, J. H.; CHEN, W. J.; LO, S. K.; CHANG, N. H. Adverse metabolic and microbiological effects of tube feeding in experimental canine obstructive Jaundice. **JPEN J.Parent. Enteral Nutr.**, Silver Spring, 21, n.1, p. 36-40, 1997.
12. CLEMENTS, W.D.; ERWIN, P.; McCAIGUE, M.D.; HALLIDAY, I.; BARCLAY, G.R.; ROWLANDS, B.J. Conclusive evidences of endotoxaemia in biliary obstruction. **Gut**, London, v.42, n.2, p. 293-299, 1998.
13. CLEMENTS, W.D.; PARKS, R.; ERWIN, P.; HALLIDAY, M.I.; BARR, J.; ROWLANDS, B.J. Role of the gut in the pathophysiology of extrahepatic biliary obstruction. **Gut**, London, v.39, n.4, p.587-593, 1996.
14. COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Princípios éticos na experimentação animal**. Rio de Janeiro, Colégio Brasileiro de Cirurgiões, 1994.
15. DAWISKIBA, J. The role of endotoxaemia in the development of renal disorders in experimental obstructive Jaundice in rats. **HPB Surg.**, Yverdon-Les-Bains v.10, n.1, p.7-10, 1996.
16. DEITCH, E.A.; KEMPER, A.C.; SPECIAN, R.D.; BERG, R.D. A study of the relationship among survival, gut-origin sepsis, and bacterial translocation in a model of systemic inflammation. **Circ. Shock**, Baltimore, v.40, n.2, p.99-104, 1993.
17. DEITCH, E.A.; SPECIAN, R.D.; GRISHAM, M.B.; BERG, R.D. Zymosan induced bacterial translocation : a study of mechanisms. **Critical Care Med.**, Baltimore, v.20, n.6, p.782-788, 1991.

18. DEITCH, E.A; SPECIAN, R.D.; BERG, R.D. Endotoxin-induced bacterial translocation and mucosal permeability : role of xanthine oxidase, complement activation, and macrophage products. **Critical Care Med.**, Baltimore,v.19,n.6, p.785-791, 1991.
19. DING, J.W.; ANDERSSON, R.; SOLTESZ, V.; WILLÉN, R.; BENGMARK, S. Obstructive jaundice impairs reticuloendothelial function and promotes bacterial translocation in the rat. **J. Surg. Res.**, New York, v.57, p.238-245, 1994.
20. DUVAL-ARAUJO, I.; PETROIANU, A.; OLIVEIRA NETO, J. E.; SABINO, L.O . Influence of bile salts on the motor response of isolated ileum to acetylcholine in rats. **Rev. Assoc. Méd. Bras.**, São Paulo, v.41, n.5, p.325-328, 1995.
21. FADEL, M.V.T. **Uso de corticosteroide na infecção grave de origem peritoneal por bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, experimentalmente induzida em camundongos.** Curitiba, 1996. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
22. FINI, A.; FEROCI, G.; FAZIO, G.; ZUMAN, P. Interaction of iron (II) with bile salts. **J. Inorg. Biochem.**, New York, v.68, n.4, p.251-256, 1997.
23. FREUDENBER, M.A.; KEPPLER, D.; GALANOS, C. Requirement for lipopolysaccharide-responsive macrophages in galactosamine-induced sensitization to endotoxin. **Infect. Immun.**, Washington, v.51, n.3,p. 891-895,1986.
24. FUJISAWA, T.; MORI, M. Influence of bile salts on beta- glucuronidase activity of intestinal bacteria. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.22, n.4, p.271-274, 1996.
25. FUJISAWA, T.; MORI, M. Influence of various bile salts on beta- glucuronidase activity of intestinal bacteria. **Lett. Appl. Microbiol.**, Oxford, v.25, n.2, p.95-97, 1997.
26. GENNARI, R.; ALEXANDER, J.W.; EAVES-PYLES, T. Effect of different combinations of dietary additives on bacterial translocation and survival in gut-derived sepsis. **JPEN J. Parent. Enteral Nutr.**, Silver Spring, v.19, n.4, p.319-325, 1995.
27. HORI, Y.; OHYANAGI, H. Protective effect of the intravenous administration of ursodeoxycholic acids against endotoxaemia in rats with obstructive jaundice. **Surg. Today**, Osaka, v.27, n.2, p.140-144,1997.
28. JARDIM, R.F.; ANDRADE, M.E.B.; AUN, W.T.; MELLO, J.F.; CRIADO, P.R. Citocinas. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.**, São Paulo, v.87, n.17, p.86-98, 1994.
29. KARAYALÇIN, K.; YERDEL, M.A.; BENGISUN, S.; TÖRÜNER, A.; OZASLAN C.; TÜRKÇAPAR AG; KESENCI M. Effect of lactulose on bacterial translocation. **Eur. J. Surg.**,Oslo, v.163, n.6, p.463-467, 1997.
30. KELLY, J.L.; O'SULLIVAN, C.; O'RIORDAIN, M.; O'RIORDAIN, D.; LYONS, A.; DOHERTY, B.S.; MANNICK, J.A; RODRICK, M.L. Is circulating endotoxin trigger for the systemic inflammatory response syndrome seen after injury? **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 225, n.5, p.530-543,1997.
31. KITANI, K. Hepatic transport of bile acids and effect of conjugation. **Ital. J.Gastroenterol.**, Pisa, v.27, n.2, p.270-276, 1995.
32. KNOBEL, E. **Conduitas no paciente grave.** São Paulo : Atheneu, 1994. p.177-181, 1994.
33. MARCHAL, N.; BOURDON, J.L.; RICHARD, C.L. **Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries.** 3.ed. Paris :Doin Editeurs. 1987.
34. MATHISON, J.C.; TOBIAS, P.S.; WOLFSON, E.; ULEVITCH, R.J. Plasma lipopolysaccharide (LPS)-binding protein. A key component in macrophage recognition of Gram-negative LPS. **J. Immunol.**, Baltimore, v.149, n.1, p.200-206, 1992.
35. NICHOLS, F.C.; GARRISON, S.W. Interferon-gamma potentiation of lipopolysaccharide-induced eicosanoid release from human monocytes. **J Interferon Res.**;New York, v.7, n.1, p.121-129, 1987.

- 36 NISSEN-MEYER, J.; HOFSLI, E.; ESPEVIK, T.; AUST GULEN, R. Involvement of tumor necrosis factor in cytotoxicity mediated by human monocytes. *Nat. Immun. Cell Growth Regul.*, Basel, v.7, n.6, p.266-279, 1988.
- 37 PAKARINEN, M.; MIETTINE, T.A.; KUUSANMÄKI, T.; VENTO, P.; KIVISTO, T.; HALTTUNEN, J. Effect of ileal autotransplantation on cholesterol, bile acids, and biliary lipids in pigs with proximal small bowel resection. *Hepatology*, Philadelphia, v.25, n.6, p.1315-1322, 1997.
- 38 PARKS, R. W.; CLEMENTS, W. D.; SMYE, M.G.; POPE, C.; ROWLANDS, B.J.; DIAMOND, T. Intestinal barrier dysfunction in clinical and experimental obstructive jaundice and its reversal by internal biliary drainage. *Br. J. Surg.*, Guildford, v.83, n. 10, p.1345-1349, 1996.
- 39 PARKS, R.W.; CLEMENTS, W.D.; POPE, C.; HALLIDAY, M.I.; ROWLANDS, B.J.; DIAMOND, T. Bacterial translocation and gut microflora in obstructive jaundice. *J. Anat.*, London, v.189, n.3, p. 561-565, 1996.
- 40 QURASHY, M.C.; CHESCOE, D.; MULLERVY, J.; COATES, M.; HINTON, R.H.; BAILEY, M.E. Influence of the gut microflora and of biliary constituents on morphological changes in the small intestine in obstructive Jaundice. *HPB Surg.*, Yverdon-Les-Bains, v.10, n.1, p.11-20, 1996.
- 41 REYNOLDS, J. V.; MURCHAN, P.; LEONARD, N.; CLARKE, P.; KEANE, F. B.; TANNER, W. A. Gut barrier failure in experimental obstructive Jaundice. *J Surg Res.*, New York, v.62, n.1, p.11-16, 1996.
- 42 RUETTEN, H.; THIEMERMANN, C. Effect of selective blockade of endothelin ETB receptors on the liver dysfunction and injury caused by endotoxaemia in the rat. *Br. J. Pharmacol.*, Basingstoke, v.119, n.3, p.479-486, 1996.
- 43 SAITOH, N.; HIRAOKA, T.; UCHINO, R.; MIYAUCHI, Y. Endotexaemia and intestinal mucosal dysfunction after the relief of obstructive Jaundice by internal and external drainage in rats. *Eur. Surg. Res.*, Basel, v. 27, n.1, p.11-18, 1995.
- 44 SCHIRMER, W.J.; SCHIRMER, J.M.; NAFF, G.B.; FRY, D.E. Systemic complement activation produces hemodynamic changes characteristic of sepsis. *Arch. Surg.*, Chigago, v.123, n.3, p.316-321, 1988.
- 45 SIEGEL, J.H.; KASMIN, F. E. Biliary tract diseases in the elderly: management and outcomes. *Gut*, London, v.41, p.433-435, 1997.
- 46 SPRONG, R.C.; AARSMAN, C.J.M.; OIRSCHOT, J.F.L.M.; 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, 1986.
- 47 STOLK, N.F.; VAN DE HEIJNING, B.J.; VAN ERPECUN, K.J.; VERHEEM, A.; AKKERMANS, L.M.; VAN BERG HENEGOUWEN, G.P. Effect of bile salts on in vitro gallbladder motility: preliminary study. *Ital. J. Gastroenterol.*, Pisa, v.28, n.2, p.105-110, 1996.
- 48 SUNG, J. Y.; COSTERTON, J.W.; SHAFFER, E.A. Defense system in the biliary tract against bacterial infection. *Dig. Dis. Sci.*, New York, v 37, n. 5, p.689-696, 1992.
- 49 SUTTON, M.B.SLJ.; STRUNK, R.C.; COLE, F.S. Regulation of the synthesis of the third component of complement and factor B in cord monocytes by lipopolysaccharide. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 136, n.4, p.1366-1372, 1986.
- 50 TAKADA, T.; YASUDA, H.; YAMAKAWA, Y.; ANDO, H.; BULKLEY, G.B.; KAMANO, T. Influence of endotoxaemia on hepatic energy metabolism in rats with obstructive Jaundice. *Hepatogastroenterology*, Stuttgart, v 43n,10, p.914-918, 1996.
- 51 TAKIKAWA, H.; WAKO, Y.; SANO, N.; YAMANAKA, M. Changes in biliary excretory mechanisms in bile duct- ligated rat. *Dig. Dis. Sci.*, New York, v 41, n.2, p.256-262, 1996.
- 52 TESH, V.L.; MORRISON, D.C. The interaction of *Escherichia coli* with normal human serum: factors affecting the capacity of serum to mediate lipopolysaccharide release. *Microb. Pathog.*, London, v 4, n.3, p.175-187, 1988.

-
- 53 THIEMERMANN, C.; RUETTEN, H.; WU, C.C.; VANE, J.R. The multiple organ dysfunction syndrome caused by endotoxin in the rat: attenuation of liver dysfunction by inhibitors of nitric oxide synthase. *Br. J. Pharmacol.*, Basingstoke, v.116, n.7, p.2845-2851, 1995.
- 54 TIRIBELLI, C.; OSTROW, J.D. New concepts in bilirubin and jaundice: report of the Third International Bilirubin Workshop. *Hepatology*, Baltimore, v.24, n.5, p.1296-1311, 1996.
- 55 TSAMANDAS, A. C.; FURUKAWA, H.; ABU ELMAGD, K.; TODO, S.; DEMETRIS, J.; LEE, R.G. Liver allograft pathology in liver/small bowel or multivisceral recipients. *Mod. Pathol.*, Baltimore, v.9, n.7, p.67-77, 1996.
- 56 VAN DE MEEBERG, P.C.; WOLFHAGEN, F. H.; VAN BERGE HENEGOUWEN, G.P.; SALEMANS, J.M.; TANGERMAN, A.; VAN BUUREN, H.R.; VANHATTUM, J.; VAN ERPECUM, K.J. Single or multiple dose ursodeoxycholic acids for cholestatic liver diseases: biliary enrichment and biochemical response. *J. Hepatol.*, Copenhagen, v.25, n.6, p.887-894, 1996.
- 57 WELSH, F.K.; RAMSDEN, C.W.; MacLENNAN, K.; SHERIDAN, M.B.; BARCLAY, G.R.; GUILLOU, P.J.; REYNOLDS, J.V. Increased intestinal permeability and altered mucosal immunity in cholestatic jaundice. *Ann. Surg.*, Philadelphia, v.227, n.2, p.205-212, 1998.
-