

**GASSAN TRAYA**

**EFEITO DA OBSTRUÇÃO BILIAR EXTRA-HEPÁTICA SOBRE TRANSLOCAÇÃO  
BACTERIANA, ENDOTOXEMIA E FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA:  
ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS**

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

Orientador :  
Dr. Clementino Zeni Neto  
Co-Orientador :  
Dr. João Carlos Domingues Repka  
Coordenador :  
Dr. Osvaldo Malafaia

**CURITIBA  
1999**



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

PARECER CONJUNTO DA COMISSÃO EXAMINADORA  
DA AVALIAÇÃO DE  
TESE/DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: **Gassan Traya**

Título da Tese: "EFEITO DO TEMPO DE OBSTRUÇÃO BILIAR EXTRA-  
HEPÁTICA SOBRE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA ENDOTOXINA E  
FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA: ESTUDO EXPERIMENTAL EM  
RATOS"

CONCEITOS EMITIDOS:

Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias - Conceito emitido **A** Equivalência **10,0**  
Prof. Dr. Julio Cesar Wiederkher - Conceito emitido **A** Equivalência **10,0**  
Prof. Dr. Rubens Valarini - Conceito emitido **A** Equivalência **10,0**

Conceito Final de Avaliação:

*Aprovado com conceito A. Equivalência 10,0*  
Curitiba, 28 de janeiro de 1999

*Jorge Eduardo F. Matias*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

*Julio Cesar Wiederkher*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Julio Cesar Wiederkher

*Rubens Valarini*  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Rubens Valarini

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Abdul e Mariam, pela coragem e determinação ao enfrentar o desconhecido, deixando sua Pátria, seus pais e irmãos, em busca de melhores condições para seus filhos. A Eles, pelos exemplos de honestidade, honradez, perseverança, companheirismo e respeito, o meu eterno agradecimento.

Ao Rached, pelo apoio e orientação em todas as fases da minha vida, sempre mostrando-me o melhor caminho, meu maior exemplo de médico, amigo e irmão

## AGRADECIMENTOS

- Ao Doutor Clementino Zeni Neto, meus sinceros agradecimentos pela dedicação firmeza e paciência, na difícil tarefa de orientar esta tese, e também pelos fortes laços de amizade.
- Ao Doutor João Carlos Domingues Repka, pela sincera e forte amizade, pelo estímulo à pesquisa científica séria, bem como, pelas incontáveis horas de trabalho e discussão, sempre com paciência e bom humor, mesmo em momentos difíceis, meu fraterno agradecimento.
- Ao Doutor Osvaldo Malafaia, meu reconhecimento pela perseverança em criar um curso de Pós-Graduação conceituado, bem como, meus agradecimentos pela confiança em mim depositada.
- Ao Médico Fabiano Elias, meus sinceros agradecimentos pelo valioso auxílio na realização dos procedimentos cirúrgicos.
- Ao Médico Eduardo Lopes Martins, meus agradecimentos pelo estímulo e colaboração nas várias etapas deste experimento.
- Ao Médico Sérgio Schwannsee Mulinari, pelo auxílio na tradução do resumo desta tese.
- Aos acadêmicos da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, Vinícius Ribas Carvalho Duarte da Fonseca, Kelly Chi, Alessandro Hartmann e Manuela Bassetti de Souza Lima, pelo valioso auxílio nas atividades cirúrgicas e laboratoriais deste estudo.
- À bibliotecária Áurea Costin, pela gentil receptividade e pela ajuda oferecida na realização e orientação das pesquisas bibliográficas.
- Ao Sr. Adhaury H. Silva, pela análise e estudo estatístico dos resultados desta tese.
- Ao Sr. Ângelo Edval Roman, pela colaboração na revisão gramatical deste trabalho.
- Ao técnico de laboratório Maurício Beker, pelo auxílio durante a realização do estudo experimental.
- Ao Instituto de Tecnologia do Paraná (TECPAR), pelo fornecimento dos animais para o experimento cirúrgico.
- À Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, por ter cedido as dependências do Laboratório de Imunologia e Microbiologia para realização deste estudo.
- Ao Laboratório das Nações, pela gentileza de realizar as dosagens de bilirrubinas.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>vi</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>viii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTA DE GRÁFICOS.....</b>	<b>xii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>xiii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>xiv</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
1.1 OBJETIVOS .....	06
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>07</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODO .....</b>	<b>27</b>
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	28
3.2 TÉCNICA OPERATÓRIA .....	28
3.2.1 GRUPO CONTROLE .....	29
3.2.2 GRUPO SIMULAÇÃO .....	29
3.2.3 GRUPO 1 DIA .....	30
3.2.4 GRUPO 2 DIAS .....	30
3.2.5 GRUPO 7 DIAS .....	30
3.2.6 GRUPO 14 DIAS .....	31
3.2.7 SACRIFÍCIO E COLETA DE AMOSTRAS .....	31
3.3 AVALIAÇÕES LABORATORIAIS .....	32
3.3.1 AVALIAÇÕES MICROBIOLÓGICAS .....	32
3.3.2 DOSAGENS DE BILIRRUBINAS .....	34
3.3.3 DOSAGENS DE ENDOTOXINAS.....	34
3.3.4 DOSAGENS DE FATOR DE NECROSE TUMORAL $\alpha$ .....	35
3.4 AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS .....	36

## SUMÁRIO

<b>4 RESULTADOS</b> .....	38
4.1 DOSAGENS SÉRICAS .....	40
4.1.1 DOSAGEM DE BILIRRUBINAS .....	40
4.1.2 DOSAGEM DE ENDOTOXINAS .....	42
4.1.3 DOSAGEM DE TNF $\alpha$ .....	43
4.2 ESTUDO MICROBIOLÓGICO .....	45
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	63
<b>ANEXO</b> .....	65
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	74

## LISTA DE ABREVIATURAS

LPS	LIPOPOLISSACARÍDEO
TNF	-FATOR DE NECROSE TUMORAL
PEG 4000 rad	-POLIETILENOGLICOL 4000 RADIOATIVO
SRE	-SISTEMA RETICULOENDOTELIAL
SSI	-SOLUÇÃO SALINA ISOTÔNICA
rpm	-ROTAÇÕES POR MINUTO
UFC/g	-UNIDADE FORMADORA DE COLÔNIA POR GRAMA
LAL	-LISADO DE AMEBÓCITOS DE <i>LIMULUS</i>
M	-MÉDIA
DP	-DESVIO PADRÃO
LI	-LIMITES DE VARIAÇÕES INFERIORES
LS	-LIMITES DE VARIAÇÕES SUPERIORES
G 1D	-GRUPO 1 DIA
G 2D	-GRUPO 2 DIAS
G 7D	-GRUPO 7 DIAS
G 14D	-GRUPO 14 DIAS
G C	-GRUPO CONTROLE
G S	-GRUPO SIMULAÇÃO
Ig A	-IMUNOGLOBULINA

## LISTA DE ABREVIATURAS

MTF	-MURAMIL TRIPEPTÍDEO FOSFATIDILETOLAMINA
Log	-LOGARITMO DECIMAL
UE	-UNIDADES ENDOTÓXICAS
°C	-GRAUS CELSIUS
H	-HEMOCULTURAS
ERP	-ESFREGAÇO DE RETROPERITÔNIO
B	-BAÇO
R	-RINS
F	-FÍGADO
P	-PULMÕES
LNM	-LINFONODOS MESENTÉRICOS
C	-CONTROLE
S	-SIMULAÇÃO
ml	-MILILITRO
μ	-MICRA

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1:** ASPECTO ILUSTRATIVO DA ICTERÍCIA NOS RATOS SOB OBSTRUÇÃO BILIAR EXTRA HEPÁTICA..... 39
- FIGURA 2:** ASPECTO ILUSTRATIVO DA DILATAÇÃO DO DUCTO BILIAR NOS RATOS SOB OBSTRUÇÃO BILIAR EXTRA HEPÁTICA..... 41

## LISTA DE TABELAS

<b><u>TABELA 1</u></b> : DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS (M) E DESVIOS PADRÕES (DP) DAS DOSAGENS DE BILIRRUBINAS (MG/DL) NOS RATOS DOS GRUPOS DE LIGADURA DE DUCTO BILIAR COMUM, SIMULAÇÃO E CONTROLE, NOS PERÍODOS DE 1, 2, 7 E 14 DIAS.....	40
<b><u>TABELA 2</u></b> : DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS (M) E DESVIOS PADRÕES (DP) DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINA (UE/ML) NOS RATOS DOS GRUPOS DE LIGADURA DE DUCTO BILIAR, SIMULAÇÃO E CONTROLE, NOS PERÍODOS DE 1, 2, 7 E 14 DIAS.....	42
<b><u>TABELA 3</u></b> : DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS (M) E DESVIOS PADRÕES (DP) DAS DOSAGENS DE TNF $\alpha$ (PG/ML) NOS RATOS DOS GRUPOS DE LIGADURA DE DUCTO BILIAR COMUM, SIMULAÇÃO E CONTROLE, NOS PERÍODOS DE 1, 2, 7 E 14 DIAS.....	44
<b><u>TABELA 4</u></b> : DEMONSTRATIVO DAS PORCENTAGENS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA NOS RATOS DOS GRUPOS DE LIGADURA DE DUCTO BILIAR, SIMULAÇÃO E CONTROLE, NOS PERÍODOS DE 1, 2, 7 E 14 DIAS.....	45
<b><u>TABELA 5</u></b> : NÚMERO MÉDIO DE ÓRGÃOS COM TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA POR RATO POR GRUPO .....	49
<b><u>TABELA 6</u></b> : DOSAGENS DE BILIRRUBINAS, ENDOTOXINAS E TNF $\alpha$ NOS RATOS DO GRUPO 1D.....	66
<b><u>TABELA 7</u></b> : DOSAGENS DE BILIRRUBINAS, ENDOTOXINAS E TNF $\alpha$ NOS RATOS DO GRUPO 2D.....	66
<b><u>TABELA 8</u></b> : DOSAGENS DE BILIRRUBINAS, ENDOTOXINAS E TNF $\alpha$ NOS RATOS DO GRUPO 7D.....	67
<b><u>TABELA 9</u></b> : DOSAGENS DE BILIRRUBINAS, ENDOTOXINAS E TNF $\alpha$ NOS RATOS DO GRUPO 14D.....	67

## LISTA DE TABELAS

<b><u>TABELA 10</u></b> : DOSAGENS DE BILIRRUBINAS, ENDOTOXINAS E TNF $\alpha$ NOS RATOS DO GRUPO CONTROLE.....	68
<b><u>TABELA 11</u></b> : DOSAGENS DE BILIRRUBINAS, ENDOTOXINAS E TNF $\alpha$ NOS RATOS DO GRUPO SIMULAÇÃO.....	68
<b><u>TABELA 12</u></b> : ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA QUALITATIVA.....	69
<b><u>TABELA 13</u></b> : ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO ÀS BILIRRUBINAS.....	69
<b><u>TABELA 14</u></b> : ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO À ENDOTOXINA.....	69
<b><u>TABELA 15</u></b> : ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO AO TNF $\alpha$ .....	70
<b><u>TABELA 16</u></b> : ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA QUANTITATIVA DE <i>Escherichia coli</i> PARA BAÇO.....	70
<b><u>TABELA 17</u></b> : ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA QUANTITATIVA DE <i>Escherichia coli</i> PARA RINS.....	70
<b><u>TABELA 18</u></b> : ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA QUANTITATIVA DE <i>Escherichia coli</i> PARA FÍGADO.....	71
<b><u>TABELA 19</u></b> : ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA QUANTITATIVA DE <i>Escherichia coli</i> PARA LINFONODOS MESENTÉRICOS.....	71
<b><u>TABELA 20</u></b> : ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA QUANTITATIVA DE <i>Enterococcus faecalis</i> PARA BAÇO.....	71
<b><u>TABELA 21</u></b> : ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA QUANTITATIVA DE <i>Enterococcus faecalis</i> PARA RINS.....	72

## LISTA DE TABELAS

- TABELA 22** : ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA QUANTITATIVA DE *Enterococcus faecalis* PARA FÍGADO..... 72
- TABELA 23** : ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA QUANTITATIVA DE *Enterococcus faecalis* PARA LINFONODOS MESENTÉRICOS..... 72
- TABELA 24** : NÚMERO MÉDIO DE BACTÉRIAS DA ESPÉCIE *Escherichia coli* POR GRUPO, NO FRAGMENTO DE INTESTINO DELGADO..... 73
- TABELA 25** : NÚMERO MÉDIO DE BACTÉRIAS DA ESPÉCIE *Enterococcus faecalis* POR GRUPO, NO FRAGMENTO DE INTESTINO DELGADO.... 73

## LISTA DE GRÁFICOS

<b><u>GRÁFICO 1</u></b> : DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS (M) E LIMITES DE VARIAÇÕES INFERIORES (LI) E SUPERIORES (LS) DAS DOSAGENS DE BILIRRUBINA (MG/DL) NOS RATOS DOS GRUPOS LIGADURA DE DUCTO BILIAR, SIMULAÇÃO E CONTROLE NOS PERÍODOS DE 1, 2, 7 E 14 DIAS.....	41
<b><u>GRÁFICO 2</u></b> : DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS (M) E LIMITES DE VARIAÇÕES (95%) DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINA (UE/ML) NOS RATOS DOS GRUPOS LIGADURA DE DUCTO BILIAR, SIMULAÇÃO E CONTROLE NOS PERÍODOS DE 1, 2, 7 E 14 DIAS.....	43
<b><u>GRÁFICO 3</u></b> : DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS (M) E LIMITES DE VARIAÇÕES (95%) DAS DOSAGENS DE TNF $\alpha$ (PG/ML) NOS RATOS DOS GRUPOS LIGADURA DE DUCTO BILIAR, SIMULAÇÃO E CONTROLE NOS PERÍODOS DE 1, 2, 7 E 14 DIAS.....	44
<b><u>GRÁFICO 4</u></b> : DEMONSTRATIVO DAS PORCENTAGENS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA NOS RATOS DOS GRUPOS LIGADURA DE DUCTO BILIAR NOS PERÍODOS DE 1, 2, 7 E 14 DIAS, SIMULAÇÃO E CONTROLE.....	46
<b><u>GRÁFICO 5</u></b> : REPRESENTAÇÃO DAS PORCENTAGENS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA POR AMOSTRAS AVALIADAS NOS GRUPOS ESTUDADOS.....	48
<b><u>GRÁFICO 6</u></b> : REPRESENTAÇÃO DO NÚMERO MÉDIO DE ÓRGÃOS COM TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA NOS GRUPOS ESTUDADOS.....	49

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da obstrução biliar extra-hepática sobre a ocorrência de translocação bacteriana, endotoxemia e Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  em ratos. Foram utilizados 60 ratos da linhagem Wistar, machos, divididos em seis grupos, com 10 ratos cada, a saber: grupo Controle, grupo Simulação, grupo 1D, grupo 2D, grupo 7D e grupo 14D. Os ratos do grupo Controle foram submetidos diretamente ao sacrifício, com coleta de sangue e órgãos, sem nenhum procedimento cirúrgico prévio. Os ratos do grupo Simulação foram submetidos a laparotomia com manipulação e simulação de ligadura do ducto biliar comum, 24 horas antes do sacrifício. Os ratos dos grupos 1D, 2D, 7D e 14D foram submetidos a ligadura do ducto biliar comum, com sacrifício após 1, 2, 7 e 14 dias respectivamente. Durante o sacrifício, foi coletado sangue por punção intracardíaca, para dosagens de bilirrubinas, endotoxinas, TNF $\alpha$  e para hemocultura. Em seguida, foram coletados *swab* de esfregaço de retroperitônio, rins, baço, fígado, pulmões e linfonodos mesentéricos para cultura, e fragmento de intestino delgado para contagem de bactérias. Cinco ratos morreram durante o experimento: 1 rato do grupo 2D, 1 rato do grupo 7D e 3 ratos do grupo Simulação. Com relação às dosagens de endotoxinas e TNF $\alpha$ , todos os grupos com obstrução biliar extra-hepática apresentaram níveis detectáveis, com aumento proporcional ao tempo de obstrução biliar extra-hepática. Ocorreu translocação bacteriana em 30% dos ratos do grupo 1D, 66,66% dos ratos do grupo 2D, 100% dos ratos dos grupos 7 e 14D e 28,57% dos ratos do grupo Simulação. Em relação ao número de bactérias translocadas, observou-se maior quantidade de bactérias nos grupos com maior tempo de obstrução biliar, sendo mais evidente no grupo 14D. Concluiu-se que obstrução biliar extra-hepática causa translocação bacteriana, endotoxemia e aumento dos níveis de TNF $\alpha$  circulantes. O aumento do tempo de obstrução biliar, cursa com aumento dos índices de translocação bacteriana, endotoxemia e TNF $\alpha$  circulantes.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of obstructive jaundice over the occurrence of bacterial translocation, endotoxemie and TNF $\alpha$  in a rat model. Sixty male Wistar rats were used, divided in 6 groups of 10 rats each, as follows: Control group, Sham ligated group, 1D group, 2D group, 7D group and 14D group. Rats in the Control group were sacrificed for blood and tissue sampling only. In the Sham ligated group, a laparotomy was performed, with manipulation and sham ligation of the common bile ducts 24 hours prior to sacrifice. In groups 1D, 2D, 7D and 14D, common bile ducts were ligated and the animals were sacrificed in 1 day, 2 days, 7 days and 14 days, respectively. During the sacrifice, blood was collected by intra-cardiac punch for bilirubins, endotoxins, TNF $\alpha$  measuring, and culture. After this, *swabs* of the retroperitoneal fluids, kidneys, spleen, liver, lungs and mesenteric limph node complex, were collected for culture, and fragment of small bowel was sent to bacterial count. Five rats died during the experiment. All rats with common bile ducts ligated had detectable levels of the endotoxins and TNF $\alpha$ , with proportional increase acquainted with obstruction time. Bacterial translocation occurred in 30% of the rats in the 1D group, 66,66% of the rats in the 2D group, 100% of the rats in the 7D and 14D groups, and 28,57% of the rats in the sham operated group. The number of translocated bacterial was higher in the groups with higher time of the biliar obstruction. This was more evident in the 14D group. In conclusion, the extra-hepatic biliar obstruction causes bacterial translocation, endotoxemie and increase of seric levels of TNF. The increased time of biliar obstruction, leads to an even higher bacterial translocation rate, endotoxemie and seric levels of TNF $\alpha$ .



A despeito de inovações nas técnicas operatórias, avanços em cuidados intensivos e anestésicos, além do desenvolvimento de novos e potentes antibióticos, que permitiram aos cirurgiões realizarem cirurgias hepatobiliares complexas e ressecções pancreáticas em pacientes ictericos, infecções e endotoxemia continuam sendo a maior causa de morbimortalidade nesses pacientes<sup>8,32,37,62</sup>. Mesmo com o desenvolvimento de novos antibióticos, o seu potencial como agentes profiláticos tem suas limitações, o que faz com que se torne necessário um maior entendimento dos mecanismos de infecção em pacientes ictericos<sup>62</sup>.

A teoria de que a passagem de bactérias e endotoxinas do trato gastro intestinal pode iniciar ou exacerbar o estado séptico está cada vez mais aceita<sup>40</sup>. A passagem de bactérias entéricas e endotoxinas induz a liberação de citocinas pelos macrófagos teciduais. As lesões orgânicas podem ser mediadas por complemento, ativação do sistema de coagulação, assim como por produtos de macrófagos e neutrófilos ativados, incluindo citocinas e proteases<sup>25</sup>. Assim, bactérias ou endotoxinas provenientes do intestino podem causar sepse, na ausência de evidências microbiológicas de infecção<sup>62</sup>.

Translocação bacteriana tem por definição a passagem de microorganismos viáveis, através da parede intestinal, para os ductos linfáticos abdominais e para a circulação sistêmica<sup>3,4,9,18,23,28,30,31,39,49,51</sup>.

Existem inúmeros modelos experimentais que demonstram a ocorrência de translocação bacteriana em situações como, desnutrição associada a queimaduras extensas e traumas severos<sup>26,34,35,36</sup>, uso de nutrição enteral<sup>5</sup>, uso de nutrição

parenteral total<sup>7,16,20</sup>, choque hemorrágico<sup>12,65,66,67</sup>, isquemia intestinal<sup>52,75</sup>, oclusão intestinal<sup>24,77</sup>, traumas térmicos<sup>48,49</sup>, uso de corticoesteróides<sup>6</sup>, depleção de células T<sup>35</sup>, administração parenteral de endotoxinas<sup>27,30</sup>, icterícia obstrutiva<sup>10,19,22,32,38,62,72</sup>, entre outros.

Em 1955, SHATTEN et al.<sup>68</sup> apresentaram o primeiro relato de translocação bacteriana após vários procedimentos cirúrgicos abdominais. Na década de 50, era popular o método de ligadura da artéria hepática para o tratamento da hipertensão portal. Após esse procedimento, eram freqüentes os relatos de necrose hepática associada à infecção bacteriana. Nessa época, ainda não havia sido demonstrado em seres humanos que bactérias do trato gastrointestinal poderiam passar para a circulação portal, mesmo na ausência de processos infecciosos intra-abdominais. Os resultados desse estudo levaram os autores a concluir que ocorria passagem de bactérias da luz intestinal para o sangue portal, com contaminação secundária do fígado.

Translocação bacteriana após ligadura do ducto biliar, comum em modelos experimentais, já foi relatada por vários autores, porém, o mecanismo pelo qual bactérias passam da luz intestinal para os ductos linfáticos não foi ainda claramente definido. DEITCH et al.<sup>32</sup> propuseram três fatores que promoveriam esse processo: desequilíbrio da microecologia nativa do intestino, lesão da mucosa intestinal e comprometimento da resposta imunológica.

Embora o intestino grosso seja o maior reservatório de bactérias Gram-negativas, sabe-se que a passagem de bactérias para ductos linfáticos abdominais e

circulação sistêmica ocorre com maior freqüência no intestino delgado. Além disso, os sais biliares são reconhecidos como inibidores do crescimento bacteriano na luz intestinal. Portanto, a ausência de bile no intestino é um dos prováveis fatores do desequilíbrio da microflora nativa.

A barreira composta de muco e células epiteliais, associada à presença da microflora intestinal normal, corresponde à primeira linha de defesa contra a translocação bacteriana. Se eventualmente essa defesa inicial não conseguir evitar a passagem de bactérias através da parede intestinal, a segunda linha de defesa, dita imunológica, através dos linfócitos e macrófagos, tenta prevenir a disseminação sistêmica dessas bactérias<sup>47</sup>.

DEITCH et al.<sup>32</sup> investigaram a ocorrência de translocação bacteriana em ratos submetidos a ligadura do ducto biliar comum, sacrificados 7 dias após a obstrução. Os autores encontraram incidência maior de translocação bacteriana nos ratos com oclusão biliar ( 33% ) comparado com os grupos Controle (5% ) e Simulação ( 7% ). Com relação à população bacteriana do ceco, não houve diferença significativa entre os três grupos.

Utilizando o mesmo modelo experimental, PARKS et al.<sup>58</sup>, observaram translocação em 62,5% dos ratos com ligadura do ducto biliar comum, contra nenhum dos grupos Controle e Simulação. Com relação à microflora intestinal, houve uma alteração qualitativa, com presença de um amplo espectro de bactérias Gram-negativas no ceco dos ratos com ligadura do ducto biliar.

SLOCUM et al.<sup>72</sup> avaliaram se, em ausência de bile no intestino, ocorreria translocação bacteriana. Para isso, submeteram ratos a ligadura do ducto biliar comum ou a uma fístula colédoco-vesical. Os autores encontraram maior incidência de translocação bacteriana nos dois grupos, em comparação com os grupos Controle e Simulação, mostrando que a translocação bacteriana não estava associada a obstrução biliar ou a icterícia, mas sim, à ausência de bile na luz intestinal.

Com a crescente evidência de que o Lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas ativam os macrófagos CD14 para a liberação de citocinas pró-inflamatórias, entre estas, o Fator de Necrose Tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), postulou-se que o aumento da população bacteriana Gram-negativa traria como consequência o aumento de  $TNF\alpha$  na corrente circulatória. Os efeitos biológicos dessas citocinas estão associados aos sintomas do choque séptico, e, recentemente, esses efeitos foram imputados ao  $TNF\alpha$ . Essa evidência emergiu em nosso meio pelos estudos envolvendo drogas inibidoras da liberação de  $TNF\alpha$  em modelos experimentais que evocassem a exacerbação da microflora Gram-negativa intestinal<sup>1,29,43</sup>.

Este estudo associa, de forma cinética, os efeitos da oclusão biliar extra-hepática à translocação bacteriana, endotoxemia e liberação de  $TNF\alpha$  em ratos Wistar.

## **1.1 OBJETIVOS**

Os objetivos do presente estudo foram:

- 1 - Verificar se obstrução biliar extra-hepática causaria translocação bacteriana.
- 2 - Verificar se obstrução biliar extra-hepática causaria endotoxemia.
- 3 - Verificar se obstrução biliar extra-hepática elevaria os níveis de TNF $\alpha$  circulante.
- 4 - Verificar se o tempo de obstrução biliar extra-hepática influenciaria os índices de translocação bacteriana, endotoxemia e TNF $\alpha$  circulante.

---

## **2-Revisão da Literatura**

---

Na revisão da literatura a seguir, serão apresentados alguns estudos que analisaram a presença de translocação bacteriana na vigência de icterícia obstrutiva, bem como translocação bacteriana associada à endotoxemia e à liberação da citocina pró-inflamatória, o TNF, por serem estudos atinentes à análise deste trabalho.

Para analisar se icterícia obstrutiva causava translocação bacteriana, DEITCH et al.<sup>32</sup> estudaram 81 ratos divididos em 3 grupos. Os animais foram sacrificados 7 dias após a realização do 1º procedimento. Foram coletados linfonodos mesentéricos, baço, fígado e ceco para cultura, além de fragmento do íleo terminal e do fígado para estudo histológico. Os autores observaram que o grupo onde o ducto biliar comum foi ligado teve incidência maior de translocação bacteriana (33%) do que os grupos Controle (5%) e Simulação (7%). Nos três grupos, as bactérias foram encontradas apenas no linfonodos mesentéricos, e as espécies mais comuns foram *Escherichia coli*, *Proteus* e *Staphylococcus sp.* A população bacteriana do ceco foi quantificada, e observou-se que o seu nível nos 3 grupos não apresentou diferença significativa, embora os ratos do grupo 3 tivessem os maiores níveis de bacilos Gram-negativos. Porém, quando os autores dividiram os ratos do grupo 3 em ratos com translocação bacteriana e ratos sem translocação bacteriana, observaram que o aumento da população bacteriana do ceco foi 100 vezes maior naqueles com translocação bacteriana. Com relação aos estudos histológicos do íleo terminal, nos ratos com ligadura do ducto biliar comum, não foram observadas ulcerações na mucosa, mas a presença de edema subepitelial, enquanto que nos ratos dos grupos Controle e Simulação os estudos histológicos foram todos normais. Portanto, esse estudo indicou que colestase extra-hepática induzida experimentalmente está

associada à translocação bacteriana para linfonodos mesentéricos. Dois fatores que parecem promover translocação bacteriana após a ligadura do ducto biliar comum são as alterações histológicas da mucosa de íleo e o desequilíbrio da microflora intestinal, resultando em crescimento de bacilos entéricos Gram-negativos.

Com o objetivo de analisar a relação da microflora intestinal e translocação bacteriana na vigência de icterícia obstrutiva, PARKS et al.<sup>58</sup> estudaram 25 ratos Wistar adultos, divididos em três grupos. Os ratos foram sacrificados 7 dias após a primeira cirurgia. Foi coletado sangue para hemocultura. Também foram coletados linfonodos mesentéricos, baço e lobo direito do fígado, para cultura. Além disso, foram coletadas amostras de 3 locais diferentes do intestino: jejuno, íleo e ceco. Os autores observaram que não houve translocação bacteriana em nenhum rato dos grupos Controle e Simulação. No grupo com ligadura do ducto biliar comum, translocação bacteriana foi demonstrada em 5 dos 8 ratos (62,5%). Esses ratos apresentavam bactérias em linfonodos mesentéricos, e 1 rato apresentou hemocultura positiva. Em todos os casos, a bactéria isolada foi *Escherichia coli*. Com relação à microflora intestinal, encontrou-se um largo espectro de organismos Gram-negativos no ceco de ratos submetidos a ligadura do ducto biliar comum, refletindo um distúrbio qualitativo na microflora cecal. O espectro dos organismos que cresceram no intestino delgado foram similares nos 3 grupos estudados. Os autores concluíram que a ligadura do ducto biliar comum causaria translocação bacteriana em modelo experimental. Distúrbio da microflora intestinal poderia ser parcialmente responsável por esse fenômeno, mas outros fatores, como injúria física da mucosa

intestinal, associada à queda da imunidade local ou sistêmica e endotoxemia sistêmica, poderiam também estar associados.

CLEMENTS et al.<sup>22</sup> avaliaram o papel do intestino na fisiopatologia da obstrução biliar extra-hepática. Para isso, dividiram 71 ratos Wistar adultos em 6 grupos. No grupo 1, o grupo Controle, foi realizada coleta de material após anestesia. No grupo 2, foi realizada ligadura do ducto biliar comum e sacrifício 1 semana depois. No grupo 3, estavam os ratos submetidos a ligadura do ducto biliar comum, com sacrifício após 3 semanas. Os grupos 4 e 5 tiveram apenas simulação da ligadura do ducto biliar e sacrifício após 1 e 3 semanas, respectivamente. No grupo 6, foi realizada uma derivação do ducto biliar comum para bexiga, através de um cateter de Silastic. Nesse grupo, o sacrifício ocorreu 1 semana após o primeiro procedimento. Durante o sacrifício, foi coletado sangue para dosagem de endotoxina pelo método do *Limulus*, realizada laparotomia com coleta de esfregação de retroperitônio com *swab* estéril, sangue portal para cultura, lobo hepático direito, pulmões direito, baço, linfonodos mesentéricos e ceco para cultura. Foi também coletado fragmentos do cólon ascendente e do íleo terminal, para estudo histológico. Nos ratos submetidos a ligadura do ducto biliar comum, houve significativa translocação bacteriana, quando comparados com os grupos de simulação e drenagem biliar. Sessenta e oito por cento dos ratos com ligadura do ducto biliar comum, sacrificados 1 semana, depois apresentaram translocação bacteriana, com comprometimento dos linfonodos mesentéricos em 64%, fígado e sangue portal em 18%. O organismo mais freqüente foi *Escherichia coli*. Os ratos do grupo 3 tiveram uma incidência similar de 60% de translocação bacteriana, porém com

comprometimento mais difuso: linfonodos mesentéricos, fígado e sangue portal em 14%, baço em 22% e pulmões em 36% dos casos. Apenas 1 rato com drenagem biliar apresentou translocação bacteriana. Ambos os grupos de ligadura do ducto biliar comum mostraram alterações qualitativas na flora cecal, com maior diversidade de bactérias isoladas, quando comparadas com o grupo Controle. Os ratos submetidos a ligadura do ducto biliar, sacrificados 3 semanas após, tiveram níveis significativamente superiores de endotoxinas, quando comparados com os ratos do grupo 5. A análise histológica do íleo terminal no grupo de ligadura do ducto biliar com sacrifício 3 semanas depois mostrou alterações inespecíficas com achatamento das vilosidades, alargamento das placas de Peyer e aumento do número de figuras de mitose. Entretanto, essas alterações foram puramente descritivas. Não houve alterações histológicas em outros grupos. Os autores concluíram que obstrução biliar por 1 ou 3 semanas causaria translocação bacteriana, embora os mecanismos pudessem ser diferentes. Ausência de bile intraluminal resultaria em aumento significativo, mas autolimitado na população Gram negativa, o que poderia justificar translocação em estágios iniciais da obstrução biliar. A duração da obstrução biliar aumentaria a endotoxemia sistêmica e seria um fator consistente, que, combinado com fatores com depressão imunológica e a quebra da física da barreira mucosa intestinal, poderia promover translocação bacteriana, perpetuando sepse sistêmica.

PARKS et al.<sup>59</sup> estudaram a perda da função da barreira intestinal em icterícia obstrutiva experimental em ratos, e clínica em 33 pacientes. O estudo experimental foi realizado com ratos Wistar adultos, que foram submetidos a ligadura do ducto biliar comum, ou a simulação da ligadura do ducto. A incidência de translocação

bacteriana e mudanças na permeabilidade intestinal foram avaliadas 1 semana depois. Para avaliação de translocação bacteriana, foram realizadas hemocultura de sangue portal e cultura de linfonodos mesentéricos, baço e lobo hepático direito. Com relação à avaliação da permeabilidade intestinal, esta foi realizada calculando-se a porcentagem de eliminação urinária em 24 h de Polietilenoglicol 4000 radioativo (PEG 4000 rad), administrado por via oral. Cada animal era seu próprio controle, e determinou-se a mudança de porcentagem na permeabilidade intestinal pré-operatória em relação ao valor encontrado após uma semana. Quanto ao estudo clínico, um estudo prospectivo foi realizado em 33 pacientes consecutivos com icterícia obstrutiva, submetidos a drenagem biliar interna como procedimento terapêutico definitivo, que poderia ser cirúrgica, endoscópica ou percutânea. Seis pacientes não ictericos submetidos a laparotomia ou colangiopancreatografia endoscópica retrógrada diagnóstica formaram o grupo Controle. Além deles, 11 voluntários sadios foram avaliados. Cada paciente foi avaliado antes do procedimento e também 1, 7 e 28 dias após. A permeabilidade intestinal foi avaliada através da excreção urinária de manitol e lactulose, administrados por via oral. A quantidade de lactulose e manitol excretados foi calculada como porcentagem da dose administrada. Quanto ao estudo experimental, os autores observaram a presença de translocação bacteriana em 7 de 12 ratos com ligadura do ducto biliar, contra nenhum do grupo de simulação. Em todos os casos, cresceu *Escherichia coli* nos linfonodos mesentéricos. Os ratos com ligadura do ducto biliar comum apresentaram um aumento significativo da permeabilidade intestinal, comparados com os do grupo de simulação (66,2% x 11,6%). Não houve diferença significativa entre os ratos que

apresentaram translocação bacteriana e aqueles ictericos que não apresentaram. A média do índice de permeabilidade intestinal lactulose:manitol nos 11 voluntários sadios não foi significativamente diferente dos pacientes do grupo Controle. No entanto, a média do índice lactulose:manitol nos pacientes ictericos foi significativamente superior à do grupo Controle. A razão lactulose:manitol em pacientes ictericos retornou ao normal 28 dias após a intervenção, e foi significativamente menor que no dia anterior ao procedimento. Esse estudo demonstrou evidências de disfunção da barreira intestinal após icterícia obstrutiva experimental, com translocação bacteriana significante e aumento da permeabilidade intestinal. Houve também aumento significativo da permeabilidade intestinal em pacientes ictericos, que retornou ao normal 28 dias após a drenagem biliar interna. Isso sugere que retorno precoce de bile ao trato gastrointestinal pode melhorar a função da barreira intestinal e reduzir a incidência de sepse de origem intestinal ou outras complicações associadas à endotoxemia em icterícia obstrutiva.

Com o objetivo de avaliar os efeitos de icterícia obstrutiva e da drenagem biliar externa na translocação, ÇAKMAKCI et al.<sup>15</sup> desenvolveram um estudo submetendo ratos a ligadura do ducto biliar comum, ou a derivação do ducto biliar comum para a pele. Quarenta ratos albinos foram divididos em 3 grupos: grupo 1 era o grupo Controle; no grupo 2, os ratos eram submetidos à ligadura do ducto biliar comum, e no grupo 3 os ratos eram submetidos à derivação do ducto biliar comum para pele. Os ratos foram sacrificados 10 dias após, quando foi coletado sangue para dosagem de bilirrubinas e hemocultura, além de *swab* de esfregaço de retroperitônio e fragmentos de fígado, baço, linfonodos mesentéricos, pulmões e

ceco. Como resultado, observou-se que houve maior incidência de translocação bacteriana para linfonodos, baço e fígado nos ratos do grupo 2, comparados com os ratos controle, porém sem significância estatística. No grupo 3 também houve aumento no índice de translocação bacteriana para linfonodos, baço e fígado, comparado com o grupo Controle, porém, com significância estatística. Não houve diferença estatística quando se comparou o grupo 2 com o 3. As culturas dos *swabs* de esfregaço de retroperitônio, feitas durante a segunda laparotomia, não evidenciaram colonização bacteriana. As principais bactérias translocadas foram *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* e *Staphylococcus aureus*. A população bacteriana do ceco foi quantificada e não houve diferença significativa entre os 3 grupos. Os autores sugeriram que a ausência de bile no intestino poderia promover translocação bacteriana para órgãos viscerais.

ÖZASLAN et al.<sup>57</sup>, em recente estudo, analisaram os efeitos da lactulose na translocação bacteriana em ratos com obstrução biliar extra-hepática. Para isso, os autores utilizaram 70 ratos Wistar albinos, divididos em 4 grupos. Os animais foram sacrificados 14 dias após o primeiro procedimento. Colheram-se *swabs* de esfregaço de retroperitônio, linfonodos mesentéricos, fígado e ceco, que foram enviados para cultura. Quando ocorreu translocação bacteriana, foi apenas para linfonodos mesentéricos. *Escherichia coli* foi a única espécie bacteriana que translocou. Houve um aumento significativo na incidência de translocação bacteriana para linfonodos mesentéricos no grupo de ratos com ligadura do ducto biliar comum, sem uso de lactulose, comparada com o grupo Simulação (40% versus 5%, respectivamente). A incidência de translocação bacteriana para linfonodos mesentéricos, no grupo de

ratos com ligadura do ducto biliar e uso de lactulose via oral, foi de apenas 10%, porém sem significância estatística, quando comparado com os animais do grupo de ligadura do ducto biliar comum sem uso de lactulose. Os autores quantificaram a população bacteriana do ceco. A única espécie bacteriana que translocou foi *Escherichia coli*, e houve um significativo aumento no número dessa espécie no grupo de ligadura do ducto biliar comum sem uso de lactulose, em comparação com os demais grupos. Tratamento com lactulose previne o crescimento bacteriano, e nesse estudo, foi associado à baixa incidência de translocação bacteriana. Os autores concluíram que a lactulose poderia reduzir a incidência de translocação bacteriana do intestino para linfonodos mesentéricos em ratos com icterícia obstrutiva.

Para avaliar se a ausência de bile no intestino promoveria translocação bacteriana, SLOCUM et al.<sup>72</sup> estudaram 90 ratos machos Sprague-Dawley divididos em 4 grupos. No grupo 1 estavam os ratos controle, não operados; no grupo 2 estavam os ratos do grupo Simulação; no grupo 3, os ratos submetidos a ligadura do ducto biliar comum, e no grupo 4, os ratos submetidos a derivação da bile para a bexiga através de uma fístula colédoco-vesical. Uma semana após o primeiro procedimento, os ratos foram submetidos ao sacrifício, com coleta de linfonodos mesentéricos, fígado, baço e ceco para estudo bacteriológico, e fígado e íleo terminal para estudo histológico. Os autores observaram que os ratos submetidos a ligadura do ducto biliar comum e a confecção de fístula tiveram uma maior incidência de translocação bacteriana para linfonodos, fígado e baço, comparados com os grupos Controle e Simulação. A incidência de translocação bacteriana foi similar entre os grupos de ligadura do ducto biliar e derivação. A incidência de translocação

bacteriana foi de 3,3% no grupo 1, 4,5% no grupo 2, 32% no grupo 3 e 41% no grupo 4. Nos grupos 3 e 4, a incidência de translocação bacteriana foi maior para linfonodos mesentéricos, que para baço e fígado. A avaliação histológica do fígado demonstrou que a congestão associada a ligadura do ducto biliar não estava presente no grupo de derivação. Portanto, translocação bacteriana no grupo de derivação não pareceu ser causada por obstrução biliar ou icterícia. A bactéria mais freqüentemente isolada foi *Escherichia coli*. O nível da população bacteriana do ceco não foi significativamente diferente entre os grupos, com exceção do grupo de derivação. Finalmente, os efeitos da ligadura do ducto biliar comum e da derivação na morfologia do íleo terminal foram analisados. A aparência histológica do íleo foi similar entre os 2 grupos. Os autores observaram a presença de edema subepitelial no íleo terminal dos ratos com ligadura do ducto biliar comum e naqueles com derivação colédoco-vesical, que não estava presente nos grupos Controle e Simulação. Os autores concluíram que é a ausência de bile no intestino que primariamente causaria lesão da mucosa e translocação bacteriana, e não a obstrução biliar.

BALL et al.<sup>10</sup> analisaram a fagocitose bacteriana em ratos com icterícia obstrutiva. Os autores utilizaram 16 ratos Sprague-Dawley divididos em 4 grupos de 4 ratos. Em cada grupo, 2 ratos eram submetidos a ligadura do ducto biliar comum e 2 a uma simulação da ligadura. Dez dias após, uma suspensão de *Staphylococcus aureus* era injetada via endovenosa, e os animais sacrificados. Foram coletadas amostras de sangue, fígado e pulmões. Os 4 grupos diferiam no intervalo entre a injeção do *Staphylococcus aureus* e o sacrifício: 15 minutos, 30 minutos, 1 hora e 3

horas. Esse estudo foi mais qualitativo que quantitativo, e os resultados não foram analisados estatisticamente. As bactérias foram eliminadas rapidamente do sangue dos animais submetidos apenas a simulação, enquanto que nos ratos submetidos a ligadura do ducto biliar comum a bacteremia foi persistente. As concentrações de bactérias no pulmões e fígado, expressas como porcentagem das bactérias injetadas, diminuíram no período de 3 horas do estudo, tanto nos ratos submetidos apenas a simulação com nos ratos com ligadura do ducto biliar. A concentração hepática de bactérias foi superior à pulmonar nos ratos submetidos a simulação da ligadura do ducto biliar. Entretanto, nos ratos com ligadura do ducto biliar, a concentração de bactérias no pulmões foi superior à do fígado, exceto no grupo de ratos de 30 minutos. O estudo de microscopia eletrônica realizado no fígado mostrou a presença de vesículas fagocitárias (bactérias) dentro das células de Kupffer, tanto nos ratos com simulação de ligadura do ducto biliar, como nos ratos com ligadura do ducto. Não houve diferença morfológica nessas vesículas em nenhum animal. Os autores sugeriram que, apesar do aspecto morfológico das células serem normais, o fato de a bacteremia ter sido mais intensa nos ratos com ligadura do ducto biliar comum, associada a uma diminuição da concentração de bactérias no fígado em relação ao pulmões, poderia ser devido a um defeito na morte intracelular da bactéria, uma diminuição da "entrega" de bactérias para as células reticuloendoteliais, ou uma combinação desses fatores.

CLEMENTS et al.<sup>21</sup> avaliaram os efeitos da obstrução biliar extra-hepática na capacidade de *clearance* das células de Kupffer. Empregaram um sistema de reperfusão, pelo qual partículas de látex de 0,75  $\mu$ m contendo isotiociano de

fluoresceína eram perfundidas através do parênquima hepático de grupos de ratos Wistar submetidos previamente à ligadura de ducto biliar, após os períodos de 1,2,3 e 4 semanas. O fluxo das partículas de látex conjugadas ao isotiocianato era medido antes e após a passagem intra-parequimatosa nos ratos. No plasma desses animais foram dosadas bilirrubinas, endotoxinas pelo método de *Limulus* e anticorpos anti-core de lipopolissacarídeos por método imunoenzimático. Os ratos avaliados após duas semanas de ligadura de ducto demonstraram significativa diminuição da capacidade de *clearance*, correlacionada a concentrações elevadas de endotoxinas e anticorpos anti-core de LPS. Concluíram que colestase está associada à diminuição da capacidade de *clearance*, e pode contribuir para a ocorrência de endotoxemia.

DING et al.<sup>37</sup>, com o objetivo de avaliar se icterícia obstrutiva provocava translocação bacteriana e prejudicava a função reticuloendotelial, realizaram estudo em 128 ratos Sprague-Dawley divididos em 2 experimentos. No primeiro, foi avaliada a função do SRE em ratos submetidos à ligadura do ducto biliar comum, ou apenas à simulação de ligadura no ducto. Essa avaliação foi realizada 3 dias, 1, 2 e 3 semanas após os procedimentos cirúrgicos. O 2º estudo foi para a avaliação de translocação bacteriana, também em ratos submetidos, ou à ligadura do ducto biliar comum, ou à sua simulação 3 dias, 1, 2 e 3 semanas após. A atividade do SRE foi avaliada através de inoculação de *Escherichia coli* radioativa, marcada com iodo na veia femoral. Essa inoculação foi realizada 3 dias, 1, 2 e 3 semanas após o procedimento cirúrgico. Os ratos eram sacrificados 15 minutos após, com coleta de fígado, baço, rins e pulmões para determinação da radioatividade dos órgãos com uso de gama-câmara. Para o estudo bacteriológico, os animais foram sacrificados 3 dias, 1, 2 e 3 semanas

após a cirurgia. Foi coletado sangue para hemocultura. Em seguida, eram coletados linfonodos mesentéricos, fígado, baço, *swab* de esfregaço de retroperitônio, bile do ducto dilatado e ceco, para cultura. Foi realizado estudo histológico do íleo terminal. Com relação aos resultados, os autores observaram que o índice de fagocitose em ratos com ligadura do ducto biliar após 3 semanas foi significativamente menor, comparados com os outros ratos ictericos. Entre os demais ictericos não foi observada diferença estatística. Todos os grupos de ratos ictericos apresentaram uma diminuição significativa no índice de fagocitose, comparados com seus controles correspondentes. O estudo bacteriológico do sangue, bile e esfregaço de retroperitônio foi negativo em todos os grupos. A positividade das culturas de linfonodos aumentou com a duração da obstrução biliar, de 33% no grupo com 3 dias de obstrução, para 47% no grupo de 2 semanas de obstrução. Depois, decresceu para 20% no grupo de 3 semanas de obstrução. Apenas 1 cultura de linfonodos foi positiva no grupo Controle de 2 semanas. A incidência de culturas de linfonodos positiva nos grupos 3 dias, 1 e 2 semanas, com ligadura do ducto biliar foi significativamente maior, comparada com seus respectivos controles. O nível de população cecal foi maior nos ratos ictericos, porém sem significância estatística, comparados com seus respectivos controles. O estudo histológico do íleo terminal mostrou nos animais ictericos, alargamento das vilosidades com edema, dilatação de ductos linfáticos e infiltração de células inflamatórias no estroma. Os autores concluíram que ictericia obstrutiva causa aumento da translocação bacteriana e prejuízo da função fagocitária do SRE.

REYNOLDS et al.<sup>61</sup> estudaram a associação entre translocação bacteriana para linfonodos mesentéricos e falha da ativação macrofágica em ratos Sprague-Dawley submetidos a obstrução biliar por 7 dias. Foram avaliados : albumina, bilirrubina, proteína C-reativa, quantificação de bactérias em linfonodos mesentéricos, bile e sangue, além da liberação de TNF, geração de superóxido-dismutase e óxido nítrico por macrófagos peritoniais. A quantificação de bactérias foi feita pelo método de diluições e contagens em placas. Para a dosagem de TNF, foi empregado o método de citotoxicidade com as células WEHI-13. A geração de superóxido-dismutase foi efetuada pelo método da redução do ferricitocromo C, e os níveis de óxido nítrico pela reação de Greiss. Encontraram significativo aumento nos níveis de bilirrubina e diminuição de albumina. A proteína C-reativa encontrava-se em níveis não detectáveis. Translocação bacteriana para linfonodos mesentéricos foi observada em 20 dos 30 ratos submetidos à ligadura de ducto biliar, em contraste à não colonização nos ratos do grupo Simulação. As bactérias encontradas foram a *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Proteus mirabilis*, variando de 5 a 10<sup>8</sup> UFC/ml do macerado de linfonodos. A resposta de produção de superóxido-dismutase de macrófagos estava significativamente diminuída quando foram comparados os animais dos grupos Controle e ligadura de ducto. A produção de óxido nítrico foi similar em ambos os grupos. Concluíram que as citocinas são produzidas em concentrações fisiológicas pelas funções autócrinas e parácrinas, e que exercem efeitos terapêuticos, contudo, quando os níveis fisiológicos são excedidos, causam efeitos tóxicos. Evidenciaram também que a hiperatividade macrofágica é danosa e está relacionada a patogênese da endotoxemia.

ROSCHER et al.<sup>64</sup> estudaram a microflora bacteriana, a produção de endotoxina e as prostaglandinas em obstrução do intestino delgado. Para isso, os autores submeteram 29 porcos a laparotomia: 18 à obstrução de intestino delgado e 11 à manipulação, secção e anastomose término-terminal do intestino delgado, para controle. Para dosagem de endotoxina, foi coletado sangue de cateter venoso central e de cateter em veia porta, 3 vezes ao dia, de todos os porcos. Para dosagem de prostaglandinas, foi coletado sangue dos 2 cateteres, 2 vezes ao dia, de 12 porcos com obstrução intestinal e 7 do grupo Controle. Os animais foram sacrificados 7 dias após o primeiro procedimento. Foram retiradas amostras do conteúdo intestinal para cultura de aeróbios e anaeróbios, através de aspiração de jejuno proximal e íleo terminal. Nos animais com obstrução de intestino delgado, houve um aumento importante da microflora do íleo e jejuno, com predomínio de *Escherichia coli*. Sessenta e quatro por cento das amostras de sangue portal e 55% das amostras de sangue venoso central, em animais com oclusão intestinal foram endotoxino-positivas. Nos animais controle, todas as amostras de sangue da veia porta foram negativas e 1,5% das amostras de sangue de veia central foram positivas. Com relação à evolução das prostaglandinas, no dia da cirurgia não houve sinais de ativação no grupo de animais controle. Naqueles animais com obstrução do intestino delgado, entretanto, foi detectada ativação das prostaglandinas no primeiro dia pós-operatório. Do primeiro ao quinto dia, o nível de prostaglandina F2 $\alpha$  no sangue portal estava pouco elevado. Porém, após o sexto dia de obstrução, houve aumento importante do nível de F2 $\alpha$  no sangue portal. Concomitantemente, com a liberação de F2 $\alpha$ , o nível de KH2 prostaglandina F2 $\alpha$  encontrava-se elevado, tanto no sangue

portal, como no sangue venoso central dos animais com obstrução intestinal, principalmente após o sexto dia. Os níveis de 6-Keto-prostaglandina F<sub>1α</sub> seguiram o mesmo padrão. Em contraste, o tromboxane B<sub>2</sub> não mostrou mudança significativa no seu nível em animais com obstrução intestinal. Tanto os valores dos animais com obstrução, como os do grupo Controle, não foram diferentes até o quinto dia, quando uma modesta elevação foi notada nos animais com obstrução intestinal.

Com o objetivo de determinar o papel das citocinas e da ativação do complemento na patogênese das lesões da mucosa intestinal induzidas por endotoxinas em translocação bacteriana, assim como para quantificar a magnitude da permeabilidade da mucosa intestinal induzida por endotoxinas, DEITCH et al.<sup>30</sup> realizaram estudo utilizando camundongos e ratos Sprague-Dawley. Para o primeiro objetivo, foram utilizados 2 grupos de experimento. No grupo 1, foi mensurada a capacidade da endotoxina de induzir translocação bacteriana em camundongos hiporresponsivos a endotoxinas, ou com deficiência de complemento. Camundongos heterogêneos ICR, foram usados para controle. No grupo 2, foi utilizado um anticorpo policlonal anti-TNF para prevenir translocação bacteriana induzida por endotoxina. Nesses 2 grupos, os camundongos foram randomizados e receberam, ou injeção de endotoxina de *Escherichia coli*, ou injeção de solução salina isotônica (SSI). O anticorpo anti-TNF foi administrado 6 horas após a injeção de endotoxina ou SSI. Vinte e quatro horas após a injeção de endotoxina ou SSI, os camundongos foram sacrificados. Durante o sacrifício, foi coletado sangue para dosagem de TNF. Também foram coletados os linfonodos mesentéricos e ceco para cultura, e fragmento do íleo para estudo histológico. Para realização do segundo objetivo,

avaliação do aumento da permeabilidade da mucosa intestinal induzida por endotoxina, utilizaram-se ratos, que, durante a anestesia, foram randomizados. Um grupo recebeu injeção de endotoxina de *Escherichia coli*, e o outro, injeção de SSI. Foi realizada a seguir, laparotomia com isolamento de segmento de 10 cm de jejuno e de íleo. Cada um deles foi cateterizado proximal e distalmente. Após a lavagem desses segmentos, as áreas isoladas retornaram para a cavidade. Uma hora após a anestesia e injeção de SSI ou endotoxina, foi injetado 75 mCi de <sup>51</sup>Cr EDTA na artéria carótida. O experimento durou 2 horas, e, durante esse período, foi coletado sangue a cada 60 minutos, e líquido de perfusão intestinal a cada 10 minutos. Também foi avaliado o pré-tratamento com alopurinol para prevenir o aumento da permeabilidade intestinal. Para isso, foi administrado alopurinol 24 ou 48 horas antes da injeção de SSI ou endotoxina. Todos os camundongos que receberam endotoxina (hiporresponsivos, deficiência de complemento e controle) apresentaram translocação bacteriana para linfonodos mesentéricos numa porcentagem significativa, enquanto os que receberam injeção com SSI apresentaram linfonodos estéreis. A maioria dos camundongos que receberam endotoxina apresentavam edema das vilosidades, ao estudo histológico do íleo. O fato de a translocação bacteriana ocorrer nos camundongos hiporresponsivos a endotoxina, e naqueles com deficiência de complemento, indica que, nem a liberação de produtos de macrófagos, nem a ativação do complemento são essenciais para que ocorra a translocação induzida por endotoxina. Esse fato foi reforçado pela observação de que, embora o pré-tratamento com anticorpo anti-TNF tenha sido efetivo em reduzir os níveis de TNF no plasma dos animais com injeção de endotoxina, ele não preveniu a

translocação bacteriana induzida pela endotoxina. Com relação à permeabilidade intestinal, 2 horas após a injeção de endotoxina, houve evidência de aumento da permeabilidade ileal, mas não a jejunal, medido pelo aumento do *clearance* do  $^{51}\text{Cr}$  EDTA. O aumento da permeabilidade ileal e da translocação bacteriana induzida por endotoxina poderia ser prevenido com pré-tratamento com alopurinol, uma vez que ele foi efetivo em diminuir a incidência de translocação bacteriana e a permeabilidade intestinal. Como o alopurinol, um inibidor competitivo da xantina-oxidase, previne a translocação e o aumento da permeabilidade intestinal, induzidos por endotoxina, isso sugere que a endotoxina promove translocação bacteriana primariamente por alterações da permeabilidade intestinal.

Recentemente REYNOLDS et al.<sup>62</sup> avaliaram a falência da barreira intestinal em icterícia obstrutiva experimental. Para isso, os autores utilizaram 164 ratos Sprague-Dawley, realizando 3 estudos diferentes. No 1º, um grupo foi submetido a ligadura do ducto biliar comum e o outro a simulação de ligadura do ducto biliar. A coleta de material se deu 1, 7 e 21 dias após. No 2º estudo, os autores também utilizaram um grupo com ligadura do ducto biliar comum, e outro com simulação de ligadura do ducto. Uma semana após, os ratos eram expostos a um trauma cirúrgico. Vinte e quatro horas depois, eram sacrificados, e procedia-se à coleta de materiais. Os ratos controle desse estudo eram compostos por animais submetidos, ou a ligadura do ducto biliar, ou sua simulação, porém, por ocasião da nova laparotomia não eram submetidos ao trauma cirúrgico. No estudo 3, como nos anteriores, os ratos foram submetidos ou a ligadura do ducto biliar comum, ou apenas a sua simulação. Uma semana após, os ratos recebiam uma injeção de endotoxina de

*Escherichia coli* ou de solução salina isotônica (SSI). Eles eram sacrificados 24 horas depois, para coleta de materiais. Em todos os estudos foram coletados linfonodos mesentéricos para cultura, sangue para hemocultura e fragmento de íleo para estudo histológico. Além disso, foi coletado sangue para a mensuração da endotoxemia sistêmica. Apenas no estudo 1 foi colhido o ceco dos ratos para estudo microbiológico. Com relação aos resultados do estudo 1, onde foi avaliada a translocação bacteriana espontânea em ratos com ligadura do ducto biliar comum, os autores observaram que não houve colonização dos linfonodos mesentéricos em nenhum dos ratos do grupo de simulação, nem naqueles com ligadura do ducto biliar com 1 dia de evolução. Entretanto, nos grupos de ligadura do ducto biliar com 7 e 21 dias, 75% tiveram colonização dos linfonodos mesentéricos. A espécie bacteriana mais freqüente foi *Escherichia coli*, em 90% dos casos. Houve aumento dos níveis de endotoxinas séricas nos ratos com ligadura do ducto biliar comum, comparados com os ratos do grupo de simulação, porém sem diferença estatística. Hemocultura foi positiva em 1 rato (8,3%) com ligadura do ducto biliar com 1 semana de evolução, e em 2 ratos (16,6%) com ligadura do ducto e 3 semanas de evolução. Não houve diferença significativa no nível da população de bacilos Gram-negativos no ceco. Com relação ao estudo 2, onde foram avaliados os efeitos do trauma cirúrgico na translocação bacteriana, os autores observaram que os ratos submetidos a simulação de ligadura do ducto biliar, e que depois foram submetidos a um trauma cirúrgico, apresentaram um índice de 33% de translocação bacteriana. Já, nos ratos com ligadura do ducto, com posterior exposição ao trauma cirúrgico, 75% tiveram translocação bacteriana. Esses ratos apresentaram 20% de hemocultura positiva

contra nenhuma no grupo de simulação. Não houve diferença entre os ratos com ligadura do ducto biliar comum e trauma cirúrgico, e ratos com ligadura do ducto e sem exposição ao trauma cirúrgico. No estudo 3, onde se avaliaram os efeitos da endotoxina na translocação bacteriana, observou-se um aumento significativo na incidência de translocação bacteriana, quando da injeção de endotoxina. No grupo de simulação e injeção de endotoxina, 40% dos ratos apresentaram translocação, e naqueles com ligadura do ducto biliar e injeção de endotoxina, 93% apresentaram translocação. Além disso, 71% dos ratos com ligadura do ducto biliar e injeção de endotoxina apresentaram hemocultura positiva, contra nenhuma no grupo de simulação e uso de endotoxina. Quando comparados com os ratos com ligadura do ducto biliar, mas sem uso de endotoxina, os ratos com ligadura do ducto e injeção de endotoxina apresentaram um aumento significativo de translocação bacteriana de 93% versus 66%, além de hemocultura positiva em 71% versus 17%. O estudo histopatológico do íleo foi normal em todos os casos. Os autores sugeriram que obstrução biliar causaria translocação bacteriana, e que esse processo seria potencializado pelo trauma cirúrgico e pela endotoxemia. Os dados suportam a tese da falência da barreira intestinal na icterícia, e sugerem que terapias objetivando diminuir translocação bacteriana merecem avaliação na profilaxia e tratamento de infecções em pacientes icterícios.

---

## **3-Material e Método**

---

### **3.1 Delimitação Experimental**

Este estudo experimental foi realizado nas dependências do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná. As normas técnicas adotadas seguiram as orientações determinadas pela Associação Brasileira de Normas Técnicas e as Normas para Apresentação de Trabalhos da Universidade Federal do Paraná. Foram adotados os Princípios Éticos para Experimentação Animal<sup>63</sup>. Para a descrição anatômica dos ratos, observaram-se as orientações de LAMBERT<sup>45</sup>.

Foram utilizados 60 ratos albinos machos, (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar-TECPAR, com peso variando entre 210 e 250 g. Os animais foram distribuídos em caixas com 5 ratos, permanecendo durante todo o experimento alojados no laboratório em temperatura ambiente, tendo livre acesso a água e ração específica para a espécie (NUVILAB-CR1, Nuvital, Curitiba).

### **3.2 Técnica Operatória**

Os ratos foram submetidos a anestesia por injeção intraperitoneal de Hidrato de Cloral a 10%, na dose de 500 mg/Kg de peso corpóreo e depois submetidos a tricotomia abdominal. Em seguida, foram fixados em decúbito dorsal. Realizou-se anti-sepsia com polivinil-pirrolidona-iodo e colocação de campos de aplicação indireta esterilizados. Para a laparotomia, foi utilizada uma incisão mediana xifo-púbica, com abertura de todos os planos da parede abdominal e exposição da cavidade

abdominal. Os procedimentos posteriores variaram conforme o grupo a que pertencia cada rato. Realizou-se a ligadura do ducto biliar comum com fio de algodão 000.

A síntese da ferida cirúrgica foi feita com sutura contínua, em dois planos, com fio Vicryl 00 (Johnson & Johnson®). Os ratos foram divididos em 6 grupos, com 10 ratos cada um, a saber:

Grupo Controle (C)	Laparotomia e coleta das amostras
Grupo Simulação (S)	Laparotomia e manipulação do ducto biliar comum
Grupo 1 dia (D1)	Ligadura do ducto biliar comum por 1 dia
Grupo 2 dias (D2)	Ligadura do ducto biliar comum por 2 dias
Grupo 7 dias (D7)	Ligadura do ducto biliar comum por 7 dias
Grupo 14 dias (D14)	Ligadura do ducto biliar comum por 14 dias

### **3.2.1 Grupo Controle**

Neste grupo, os ratos normais foram submetidos diretamente ao sacrifício, com coleta de sangue e retirada das amostras de esfregaço do retroperitônio, rins, fígado, baço, pulmões, linfonodos mesentéricos e fragmento de intestino.

### **3.2.2 Grupo Simulação**

Neste grupo, após laparotomia, foi realizada exposição do ducto biliar comum, com reparo do mesmo com fio de algodão 000, porém sem ligadura. Vinte e quatro horas após, os ratos foram submetidos ao sacrifício e coletadas amostras de sangue

e de esfregaço do retroperitônio, rins, fígado, baço, pulmões, linfonodos mesentéricos e fragmento de intestino.

### **3.2.3 Grupo 1 Dia**

Neste grupo, foi realizada a exposição do ducto biliar comum, com ligadura do mesmo com fio de algodão 000. Vinte e quatro horas após, os ratos foram submetidos ao sacrifício, com coleta de amostras de sangue e de esfregaço do retroperitônio, rins, fígado, baço, pulmões, linfonodos mesentéricos e fragmento de intestino.

### **3.2.4 Grupo 2 Dias**

Neste grupo, foi realizada a exposição do ducto biliar comum, com ligadura do mesmo com fio de algodão 000. Dois dias após, os ratos foram submetidos ao sacrifício, coleta de sangue e de esfregaço do retroperitônio, rins, fígado, baço, pulmões, linfonodos mesentéricos e fragmento de intestino.

### **3.2.5 Grupo 7 Dias**

Neste grupo, foi realizada a exposição do ducto biliar comum, com ligadura do mesmo com fio de algodão 000. Sete dias após, os ratos foram submetidos ao sacrifício e coleta de sangue e de esfregaço do retroperitônio, rins, fígado, baço, pulmões, linfonodos mesentéricos e fragmento de intestino.

### **3.2.6 Grupo 14 Dias**

Neste grupo, foi realizada a exposição do ducto biliar comum, com ligadura do mesmo com fio de algodão 000. Quatorze dias após, os ratos foram submetidos ao sacrifício e coleta de sangue e de esfregaço do retroperitônio, rins, fígado, baço, pulmões, linfonodos mesentéricos e fragmento de intestino.

### **3.2.7 Sacrifício e Coleta de Amostras**

Excetuando-se os ratos do grupo Controle, que foram submetidos diretamente ao sacrifício, os outros ratos, dependendo do grupo a que pertenciam, foram submetidos ao sacrifício 1, 2, 7 e 14 dias após a realização do primeiro procedimento. Ao término do tempo de estudo de cada grupo, os ratos foram anestesiados por inalação de éter sulfúrico, colocados em decúbito dorsal e submetidos a punção intracardíaca com agulha 25x8 mm e seringa de 10 ml heparinizada. O sangue coletado foi destinado a hemocultura e dosagens bioquímicas. Para hemocultura, 1 ml de sangue era semeado em meio de cultura (a ser descrito posteriormente), imediatamente após a coleta. O volume de sangue restante era imediatamente centrifugado por 10 minutos a 5000 rpm em centrífuga refrigerada a 5° C (Bio Research®), em tubos de centrífuga despirogenizados. O plasma foi separado em duplicatas com pipetas despirogenizadas e armazenado a -20° C, em frascos de vidro, também despirogenizados.

Os ratos foram sacrificados por exanguinação por punção intra-cardíaca e fixados em decúbito dorsal. Procedeu-se à anti-sepsia com polivinil-pirrolidona-iodo e colocação de campos indiretos esterilizados. Em seguida, ressecou-se a parede tóraco-abdominal anterior, com exposição das cavidades abdominal e torácica. Inicialmente, colheu-se esfregaço de retroperitônio com uso de *swab* estéril, e logo a seguir a coleta dos rins, baço, fígado, pulmões, linfonodos mesentéricos e fragmento de intestino delgado, sempre nessa seqüência para todos os animais, e utilizando-se conjuntos separados de pinças e tesouras previamente esterilizados. Imediatamente essas amostras eram processadas conforme metodologia a ser descrita posteriormente.

### **3.3 Avaliações Laboratoriais**

#### **3.3.1 Avaliações Microbiológicas**

Para avaliação de translocação bacteriana, é consenso que a pesquisa de bactérias indicadoras de contaminação fecal, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, é o indicador desse processo. Para essa finalidade, as amostras estudadas foram submetidas às seguintes etapas:

1. Pesagem da amostra.
2. Trituração sobre tela de nylon com 20  $\mu$  de porosidade e diluição do macerado em 5 ml de água peptonada a 10%.
3. Retirado 1 ml do macerado diluído e procedeu-se às diluições decimais

-1, -2, -3, -4, -5, -6 em tubos de ensaio contendo 9 ml de água peptonada esterilizada.

4. Após a confecção das diluições, 1 ml de cada tubo, inclusive do macerado diluído, era semeado em duas placas de Petri e a seguir distribuídos 15 ml de Agar Eosina Azul de Metileno segundo Teague (BIOBRAS®) e Kenner Fecal Streptococcus (DIFCO®), acrescidos de 1 ml de solução de Cloreto de Trifenil Tetrazolium (MSD®).
5. Após a solidificação dos meios, as placas eram incubadas a 37 °C por 48 horas, e a seguir eram contadas as colônias formadas e anotados os resultados em protocolo.
6. As colônias isoladas em meio de Eosina Azul de Metileno com características de *Escherichia coli* (negras ou com cor verde metálica) eram repicadas para o meio de Pessoa e Silva para a identificação confirmatória.
7. Calculou-se a quantidade de bactérias na amostra, dada em Unidade Formadora de Colônias por grama de amostra (UFC/ g da amostra) através da seguinte fórmula:

$$\text{UFC/g da amostra} = \frac{\text{UFC/placa} \times 5 \times \text{Fator de diluição}}{\text{Peso da amostra (g)}}$$

A seguir, transformaram-se os valores quantitativos de Unidades Formadoras de Colônias por grama, em logaritmos decimais (log UFC/g).

As amostras para hemocultura, com 1 ml de sangue, foram coletadas em 9 ml de caldo tripticaseína de soja e incubadas por 7 dias a 36 °C, e inspecionadas

diariamente para a verificação da existência ou não de crescimento bacteriano. O mesmo procedimento foi realizado para os *swabs* com esfregaço do retroperitônio.

### **3.3.2 Dosagens de Bilirrubinas**

Foram executadas pelo sistema automatizado COBAS-MIRA com reativos específicos. A bilirrubina, na forma direta, está esterificada com glucoronídeos e na forma indireta não é esterificada. A fração direta, na presença do para-benzeno-diazosulfonato, reage por copulação, formando a azo bilirrubina. A fração total reage com o ácido sulfanílico diazotado após adição de benzoato de sódio e cafeína. A intensidade de cor produzida pelas duas frações é proporcional à concentração de bilirrubina presente na amostra, e apresenta absorção máxima em 530 nm.

### **3.3.3 Dosagens de Endotoxinas**

Para a dosagem de endotoxinas, foi empregado o método do Limulus Amebocyte Lisate (ENDOSAFE 1073®), que tem por princípio a capacidade dos amebócitos extraídos do crustáceo *Limulus polyphemus* de gelificarem-se em presença de endotoxinas (LPS). Essa gelificação é consequência da ativação da enzima zimogênica serin-protease em presença de cátions divalentes, que produzem o coagulogênio do *Limulus*. Para a análise qualitativa de endotoxina no plasma dos ratos, foi distribuído 0,1 ml da amostra em tubo contendo o reagente LAL (Lisado de Amebócitos de *Limulus sp*) e incubada a 37 °C por uma hora .

Após esse período, foi realizada a leitura. Se a amostra produzisse reação de gelificação, era realizada a análise quantitativa da endotoxina. Para essa análise, eram realizadas diluições com fator 2 de diluição 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16. Após, distribuídos 0,1 ml de cada diluição em tubos contendo 0,1ml do reagente LAL e incubados a 37° C por 1 hora. Se a amostra produzisse reação de gelificação, procedia-se ao cálculo do teor de endotoxina em Unidades Endotóxicas/ml, multiplicando a sensibilidade do reagente LAL pela última diluição que produziu reação de gelificação.

#### **3.3.4 Dosagens de Fator de Necrose Tumoral $\alpha$**

Para dosagem do Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), foi utilizada a técnica imunoenzimática quantitativa, na qual um anticorpo monoclonal específico anti-TNF $\alpha$  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  $\mu$ l, incubadas e submetidas à revelação com anticorpos monoclonais anti-TNF $\alpha$  conjugados com peroxidase, os quais, reagindo com peróxido de hidrogênio, irão desenvolver cor mensurável em espectrofotômetro a 450 nm de comprimento de onda. O desenvolvimento da cor indica a presença do TNF $\alpha$  na amostra, que será proporcionalmente maior quanto maior for a intensidade da leitura espectrofotométrica. Para a dosagem do TNF $\alpha$ , foram distribuídos 50  $\mu$ l da amostra em cada orifício da placa de Terazaki. A seguir, distribuídos 50  $\mu$ l de cada diluição do

TNF $\alpha$  padrão que continham: 43 pg/ml, 86 pg/ml, 172 pg/ml, 344 pg/ml, 697 pg/ml, 1375 pg/ml e 2000 pg/ml, e incubados por 2 horas à temperatura ambiente.

Após essa etapa, o conteúdo da placa foi esvaziado por inversão e a placa lavada 3 vezes com tampão fosfatos pH 7,5. Em seguida, foram distribuídos 100  $\mu$ l do conjugado diluídos a 1/3000 (anticorpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  conjugado a peroxidase), em cada um dos orifícios, e incubados à temperatura ambiente por 1 hora.

Novamente o conteúdo da placa foi esvaziado por inversão e a placa lavada 3 vezes com tampão fosfatos pH7,5. Foram distribuídos 20  $\mu$ l de peróxido de hidrogênio a 30% em cada um dos orifícios, e a seguir distribuídos 10  $\mu$ l de Ortofenilenediamino (50 mg em 25 ml de tampão Cítrato pH 5,0) e incubados por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 10  $\mu$ l de ácido sulfúrico 10N. Após essas etapas, foi lida a absorbância do conteúdo de cada orifício em espectrofotômetro a 450 nm. Depois, foram interpolada as leituras dos padrões de TNF $\alpha$  de rato às leituras das amostras. Calculou-se, por regressão linear, a quantidade de TNF $\alpha$  presente nas amostras, em picogramas/ml.

### **3.4 Avaliações Estatísticas**

Para a comparação entre os grupos, em relação à presença ou não de translocação bacteriana, utilizou-se o teste exato de Fisher, que é um teste não paramétrico para grupos independentes.

Para a comparação entre os grupos com relação aos níveis de bilirrubinas, endotoxinas,  $TNF\alpha$  e índices de translocação bacteriana, utilizou-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Para a identificação das diferenças entre os grupos, utilizou-se o teste de Comparações Múltiplas.

Para a comparação entre os grupos, em relação à contagem do número de bactérias no intestino delgado, utilizou-se o teste paramétrico "F" de Snedecor. Para a localização das diferenças entre os grupos, foi utilizado o teste de Duncan.

Foram consideradas significativas as diferenças com nível de significância de 5%.

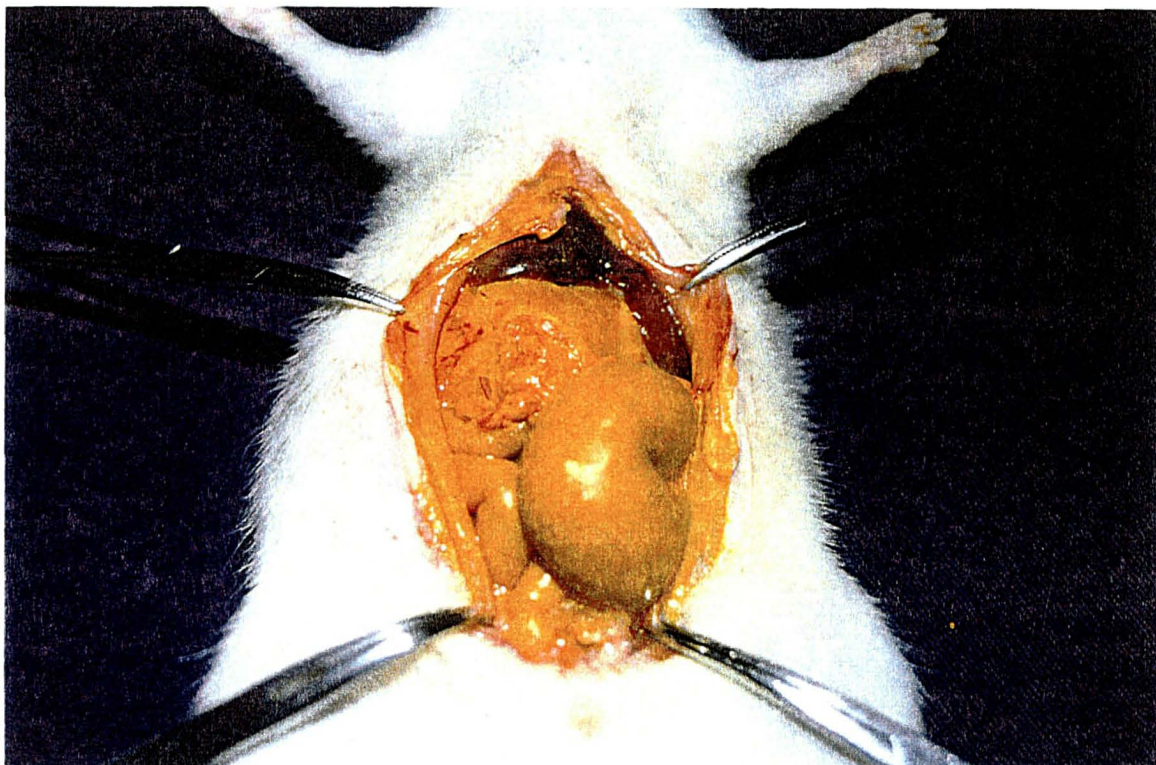


Durante a realização deste estudo experimental, ocorreram 5 óbitos: 1 no grupo 2D, 1 no grupo 7D, e 3 no grupo Simulação.

Todos os ratos apresentavam evidências macroscópicas de icterícia (Figura 1). Durante a coleta de materiais, observou-se dilatação importante do ducto biliar comum, acima da ligadura, nos ratos dos grupos 1D, 2D, 7D e 14D (Figura 2). Nos ratos dos grupos Controle e Simulação, o calibre do ducto biliar comum não apresentava dilatação.

Os resultados individuais de cada animal avaliado, bem como as avaliações estatísticas dos grupos encontram-se disponíveis no Anexo.

**FIGURA 1** : ASPECTO ILUSTRATIVO DA ICTERÍCIA NOS RATOS SOB OBSTRUÇÃO BILIAR EXTRA-HEPÁTICA



## 4.1 Dosagens Séricas

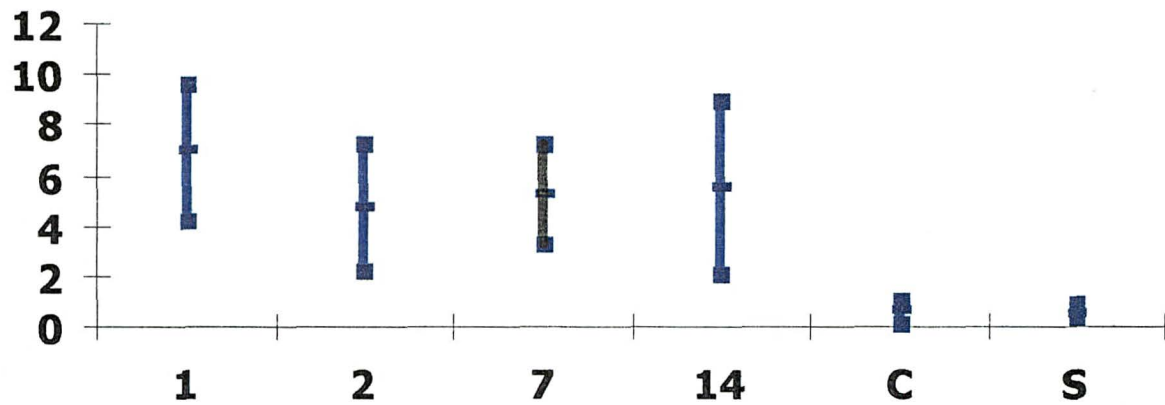
### 4.1.1 Dosagem de Bilirrubinas

Excetuando-se os dos grupos Controle e Simulação, todos os ratos dos demais grupos apresentavam hiperbilirrubinemia, comprovando a efetividade da ligadura do ducto biliar comum (Gráfico 1, Tabela 1 e Tabela – Anexos). Observaram-se diferenças estatisticamente significantes entre as comparações dos grupos Controle e Simulação com os grupos com ligadura do ducto biliar comum. Quando se compararam os valores dos grupos com ligadura do ducto biliar comum entre si, observou-se diferença estatisticamente significativa entre o grupo 1D com os demais. Não houve diferença estatisticamente significativa quando comparou-se o grupo Controle com o grupo Simulação.

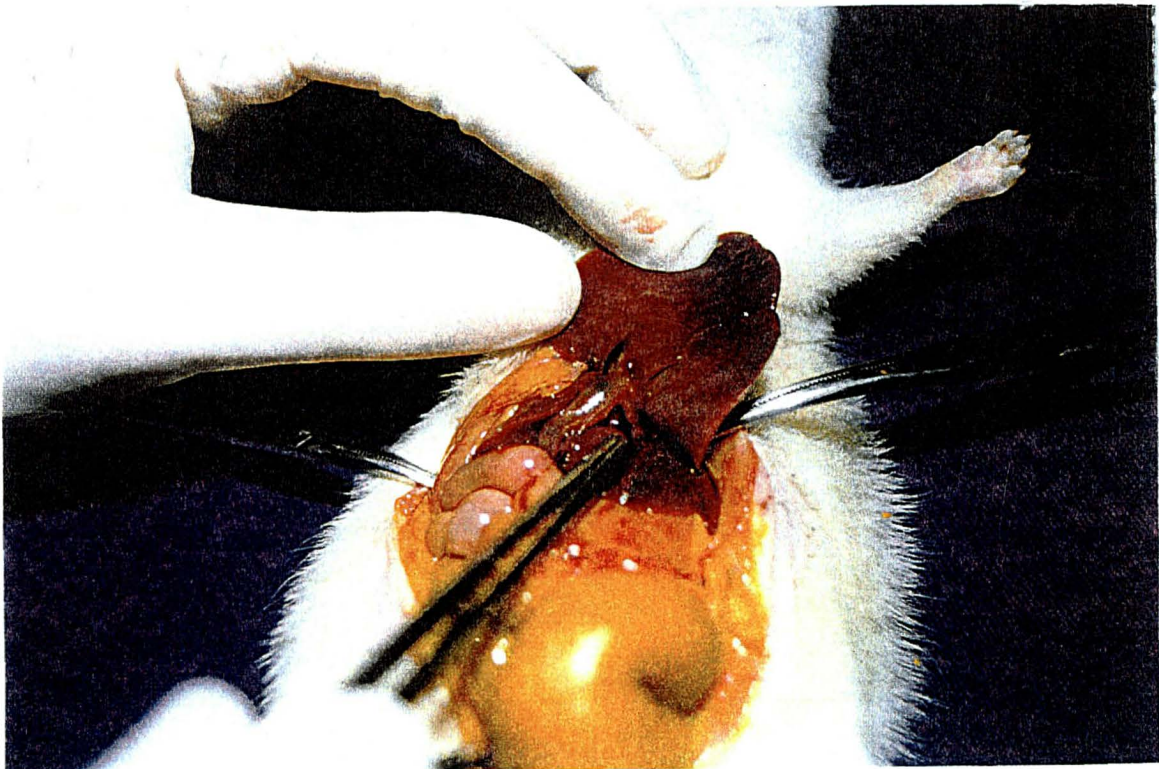
**TABELA 1** : DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS(M) E DESVIOS PADRÕES (DP) DAS DOSAGENS DE BILIRRUBINAS (MG/DL) NOS RATOS DOS GRUPOS DE LIGADURA DE DUCTO BILIAR, NOS PERÍODOS DE 1, 2, 7 E 14 DIAS, SIMULAÇÃO E CONTROLE.

Grupo	Média +/- DP
1D	6,98 +/- 1,38
2D	4,76 +/- 1,28
7D	5,26 +/- 1,01
14D	5,49 +/- 1,76
Controle	0,25 +/- 0,61
Simulação	0,57 +/- 0,21

**GRÁFICO 1** : DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS (M-) E LIMITES DE VARIAÇÕES INFERIORES (LI) E SUPERIORES (LS) DAS DOSAGENS DE BILIRRUBINA (MG/DL) NOS RATOS DOS GRUPOS LIGADURA DE DUCTO BILIAR, NOS PERÍODOS DE 1, 2, 7 E 14 DIAS, SIMULAÇÃO E CONTROLE.



**FIGURA 2** : ASPECTO ILUSTRATIVO DA DILATAÇÃO DO DUCTO BILIAR NOS RATOS SOB OBSTRUÇÃO BILIAR EXTRA-HEPÁTICA



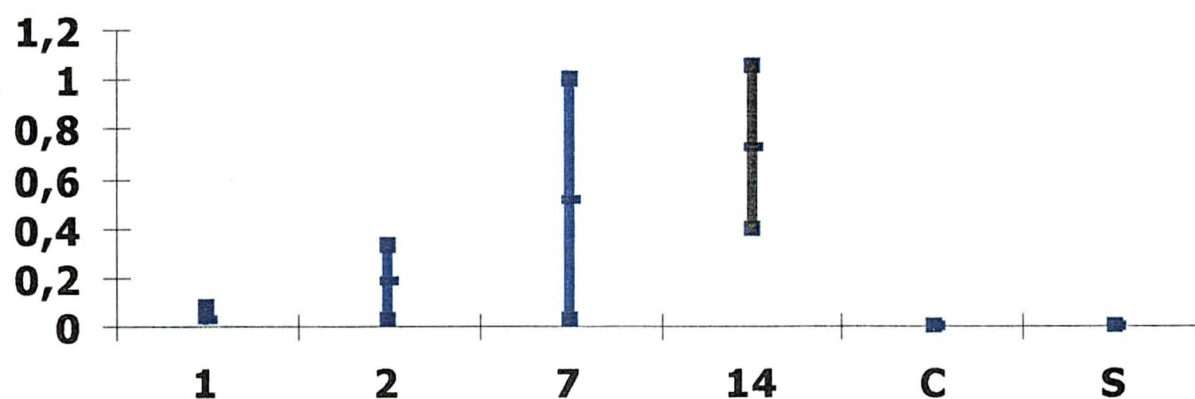
#### 4.1.2 Dosagem de Endotoxinas

Exetutando-se os ratos dos grupos Controle e Simulação, que não apresentavam endotoxinas circulantes detectáveis, os ratos dos demais grupos apresentavam elevação dos níveis de endotoxinas, com aumento diretamente proporcional ao tempo de ligadura. Comparando-se os grupos com obstrução biliar extra-hepática entre si, só não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos 7D e 14D.

**TABELA 2** : DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS(M) E DESVIOS PADRÕES (DP) DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINA (UE/ML) NOS RATOS DOS GRUPOS DE LIGADURA DE DUCTO BILIAR, NOS PERÍODOS DE 1, 2, 7 E 14 DIAS, SIMULAÇÃO E CONTROLE.

Grupo	Média +/- DP
1D	0,02 +/- 0,03
2D	0,18 +/- 0,08
7D	0,51 +/- 0,25
14D	0,72 +/- 0,17
Controle	Não detectável
Simulação	Não detectável

**GRÁFICO 2** : DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS (M) E LIMITES DE VARIAÇÕES (95%) DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINA (UE/ML) NOS RATOS DOS GRUPOS LIGADURA DE DUCTO BILIAR, NOS PERÍODOS DE 1, 2, 7 E 14 DIAS, SIMULAÇÃO E CONTROLE.



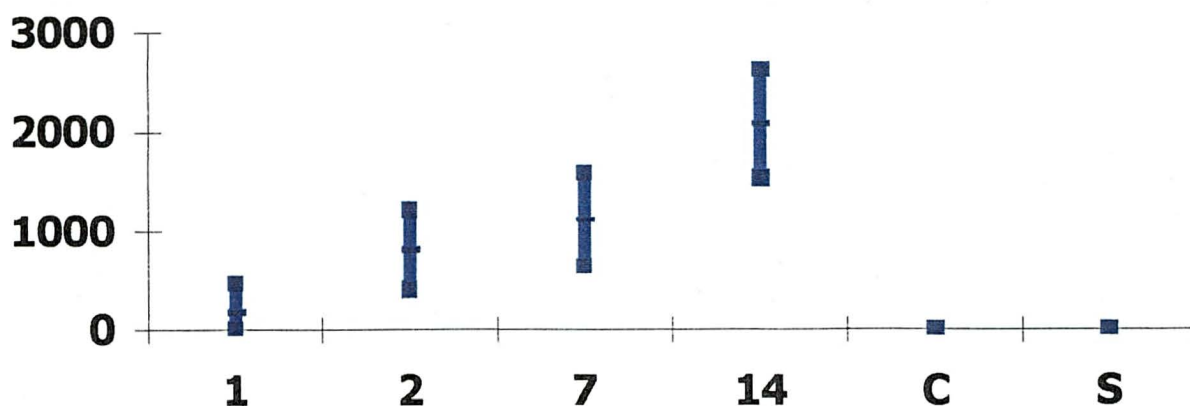
#### 4.1.3 Dosagem de $\text{TNF}\alpha$

Com exceção dos ratos dos grupos Controle e Simulação, todos os demais grupos apresentaram níveis detectáveis, com aumento dos níveis de  $\text{TNF}\alpha$  relacionados com o aumento no tempo de obstrução biliar. Quando foram comparados os grupos com ligadura do ducto biliar comum entre si, só não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos 2D e 7D.

**TABELA 3** : DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS(M) E DESVIOS PADRÕES (DP) DAS DOSAGENS DE TNF $\alpha$  (PG/ML) NOS RATOS DOS GRUPOS DE LIGADURA DE DUCTO BILIAR, NOS PERÍODOS DE 1, 2, 7 E 14 DIAS, SIMULAÇÃO E CONTROLE.

Grupo	Média +/- DP
1D	173,30 +/- 145,76
2D	810,33 +/- 203,69
7D	1111,11 +/- 241,09
14D	2073,30 +/- 275,46
Controle	Não detectável
Simulação	Não detectável

**GRÁFICO 3** : DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS (M) E LIMITES DE VARIAÇÕES (95%) DAS DOSAGENS DE TNF $\alpha$  (PG/ML) NOS RATOS DOS GRUPOS LIGADURA DE DUCTO BILIAR, NOS PERÍODOS DE 1, 2, 7 E 14 DIAS, SIMULAÇÃO E CONTROLE.



## 4.2 Estudo Microbiológico

O número total de ratos que apresentaram translocação bacteriana em cada grupo foi, 3/10 (30%) no grupo 1D, 6/9 (66,66%) no grupo 2D, 9/9 (100%) no grupo 7D, 10/10 (100%) no grupo 14D, 2/7 (28,57%) no grupo Simulação e 0/10 (0%) no grupo Controle (Gráfico 4 e Tabela 4). Comparando-se os grupos entre si, observou-se que houve diferença estatisticamente significante quando foram comparados os grupos 7D e 14D com os grupos Controle, Simulação e 1D, e comparando-se o grupo Controle com o grupo 2D. Nas demais comparações não houve diferença estatisticamente significante.

**TABELA 4** : DEMONSTRATIVO DAS PORCENTAGENS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA NOS RATOS DOS GRUPOS DE LIGADURA DE DUCTO BILIAR, NOS PERÍODOS DE 1, 2, 7 E 14 DIAS, SIMULAÇÃO E CONTROLE.

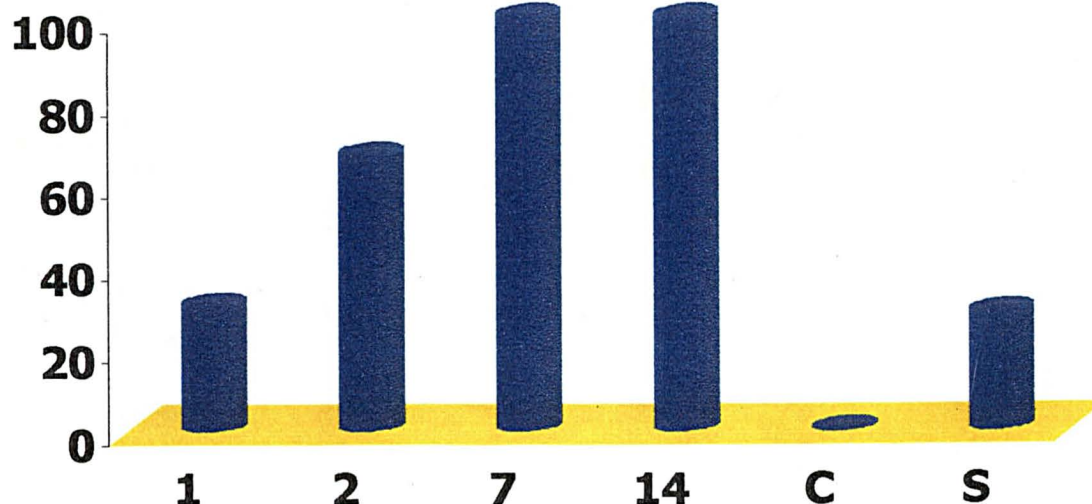
Grupo	Translocação/Total	%
1D	3/10	30%
2D	6/9	66,66%
7D	9/9	100%
14D	10/10	100%
Controle	0/10	0%
Simulação	2/7	28,57%

Em relação às hemoculturas, no grupo 14D observou-se que as mesmas foram positivas em 40% dos ratos(4/10), o que foi estatisticamente significativo ( $p=0,00018$ ). Nos demais grupos as hemoculturas foram todas negativas.

As culturas dos esfregaços de retroperitônio foram negativas em todos os grupos. O mesmo ocorreu com as culturas de pulmões, onde não houve crescimento de bactérias indicadoras de translocação bacteriana em nenhuma amostra de nenhum rato.

Com relação às culturas de rins, encontrou-se desenvolvimento de bactérias em 70% dos ratos (7/10) do grupo 14D. Nos demais ratos dos outros grupos, não houve desenvolvimento de bactérias.

**GRÁFICO 4** : DEMONSTRATIVO DAS PORCENTAGENS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA NOS RATOS DOS GRUPOS LIGADURA DE DUCTO BILIAR NOS PERÍODOS DE 1, 2, 7 E 14 DIAS, SIMULAÇÃO E CONTROLE



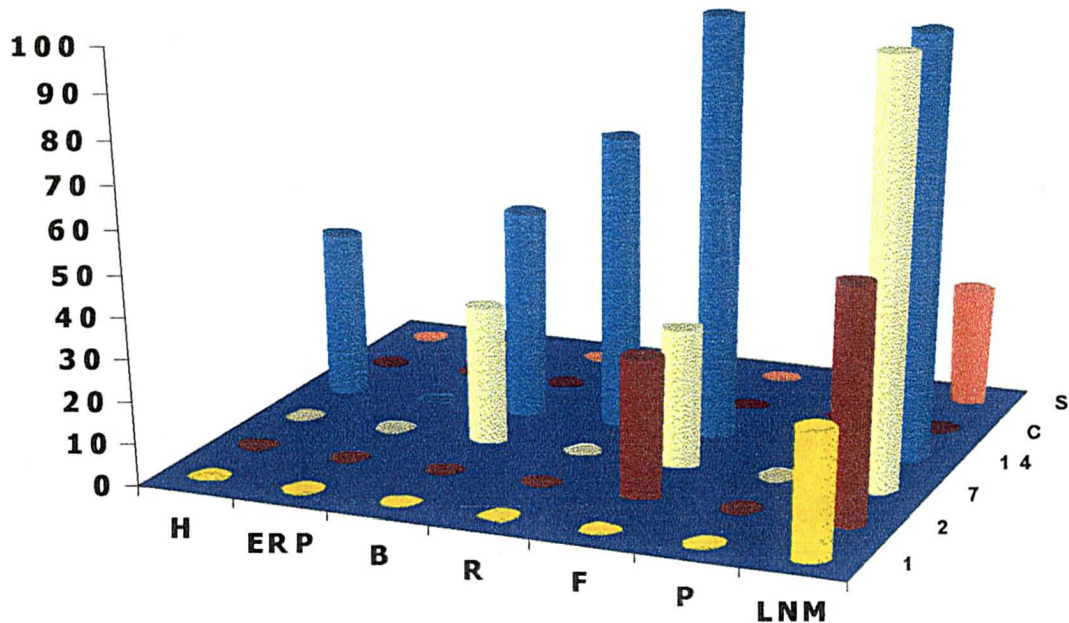
Nas culturas esplênicas, essas foram positivas em 33,33% dos ratos (3/9) do grupo 7D e em 50% dos ratos (5/10) do grupo 14D. Nos demais grupos, mostraram-se negativas.

Quando foram avaliadas as culturas de fígado, os resultados encontrados foram positivos em 33,33% dos ratos (3/9) do grupo 2D, em 33,33% dos ratos (3/9) do grupo 7D e em 100% dos ratos (10/10) do grupo 14D. Nos demais grupos, os resultados foram negativos.

Quanto às culturas dos linfonodos mesentéricos, ocorreu translocação bacteriana em 30% dos ratos (3/10) do grupo 1D, em 55,55% dos ratos (5/9) do grupo 2D, em 100% dos ratos (9/9) do grupo 7D, em 100% dos ratos (10/10) do grupo 14D. No grupo Simulação, 28,57% dos ratos (2/7) apresentaram translocação bacteriana.

Esses resultados são demonstrados no Gráfico 5.

**GRÁFICO 5** : REPRESENTAÇÃO DAS PORCENTAGENS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA POR AMOSTRAS AVALIADAS NOS GRUPOS ESTUDADOS

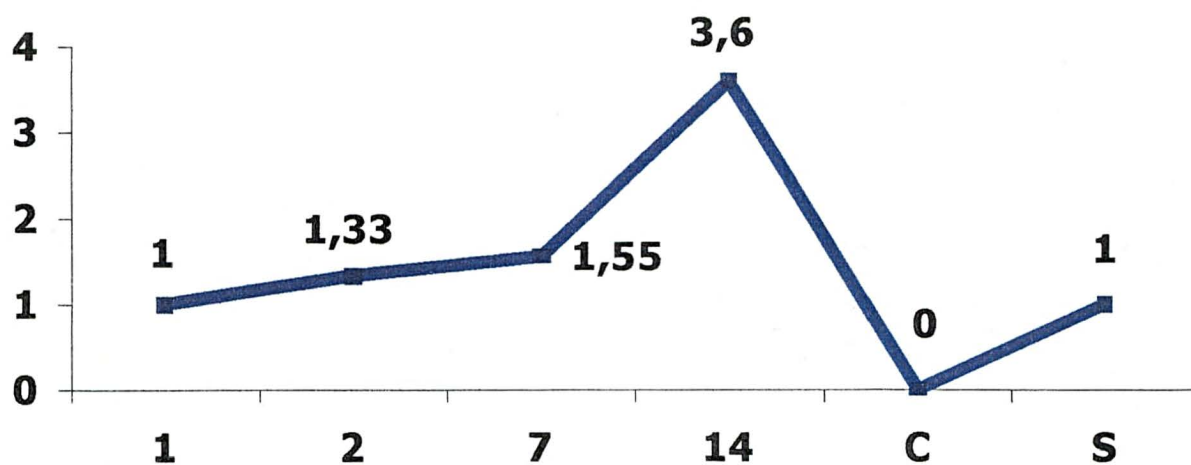


Também foi avaliado o número médio de órgãos com translocação bacteriana por rato de cada grupo, e o que se observou foi a presença de translocação bacteriana em 1 órgão no grupo 1D, 1,33 órgãos no grupo 2D, 1,55 órgãos no grupo 7D, 3,6 órgãos no grupo 14D, 1 órgão no grupo Simulação e nenhum órgão no grupo Controle (Gráfico 6 e Tabela 5).

**TABELA 5** : NÚMERO MÉDIO DE ÓRGÃOS COM TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA POR RATO, POR GRUPO.

Grupo	Média
1D	1
2D	1,33
7D	1,55
14D	3,6
Controle	0
Simulação	1

**GRÁFICO 6** : REPRESENTAÇÃO DO NÚMERO MÉDIO DE ÓRGÃOS COM TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA NOS GRUPOS ESTUDADOS :



Foram realizadas comparações quantitativas de translocação bacteriana entre os grupos. Quando comparou-se translocação bacteriana para baço, observou-se

que, em relação à *Escherichia coli* houve diferença estatisticamente significativa apenas no grupo 14D, ( $p=0,0018$ ). Em relação ao *Enterococcus faecalis* não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos onde isso ocorreu ( $p=0,1025$ ).

Quando compararam-se os índices de translocação bacteriana para rins, os resultados demonstraram diferença estatisticamente significativa apenas no grupo 14D, tanto para *Escherichia coli*, quanto para *Enterococcus faecalis* ( $p=1,1464^{-5}$  e  $p=0,0155$ , respectivamente). Nos demais grupos, não houve diferença estatisticamente significativa.

Os mesmos resultados foram observados em relação à translocação bacteriana para fígado, onde só foi encontrada diferença estatisticamente significativa no grupo 14D, para as duas bactérias indicadoras de translocação ( $p=6,9387^{-7}$  para *Escherichia coli* e  $p=0,0019$  para *Enterococcus faecalis*). Nos demais grupos, não houve diferença estatisticamente significativa.

Em relação à translocação bacteriana de *Escherichia coli* para linfonodos mesentéricos, quando os grupos foram comparados entre si, observou-se que não existem diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Simulação x 1D, Simulação x 2D, Controle x 1D, 2D x 7D e 7D x 14D. Nas demais comparações entre grupos Controle x Simulação, Controle x 2D, Controle x 7D, Controle x 14D, Simulação x 14D, 1D x 2D, 1D x 7D, 1D x 14D e 2D x 14D, observaram-se diferenças estatisticamente significantes ( $p=8,2076^{-6}$ ). Em relação à translocação de

*Enterococcus faecalis* observaram-se diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Controle x 2D, Controle x 7D, 1D x 2D, 1D x 7D e 2D x 14D ( $p=0,03251$ ).

Comparando-se o número de bactérias no intestino delgado, os achados mostraram que houve diferença estatisticamente significativa tanto para *Escherichia coli* quanto para *Enterococcus faecalis* apenas entre os grupos Simulação x 14D ( $p=0,0163$  e  $p=0,0029$  respectivamente).



Entre as funções do trato gastrointestinal, estão incluídos complexos processos de digestão, absorção e secreção. Em seu interior, apresentam-se bactérias, seus metabólitos e toxinas, que devem ser bloqueados de forma seletiva, concomitantemente à absorção de nutrientes. Para realizar essa função, o intestino mobiliza métodos imunológicos e não imunológicos também complexos, que, por sua vez, permitem prevenir a passagem de bactéria da luz intestinal para outros órgãos, como linfonodos e destes para a circulação sistêmica. Esse mecanismo é denominado, genericamente, de barreira intestinal<sup>76</sup>.

Quando esses processos de defesa apresentam alterações, bactérias viáveis da luz intestinal podem passar para a circulação sistêmica, tomando-se assim, fator relevante no desenvolvimento de sepse e de disfunções de múltiplos órgãos e sistemas<sup>13,27,28</sup>.

Diversas condições que geram resposta inflamatória severa, tais como, queimaduras<sup>4,17,26</sup>, traumas<sup>13,34</sup> ou infecções<sup>23,56</sup> são capazes de levar à falência de barreira intestinal. O estado nutricional também é importante para manutenção dessa barreira<sup>54</sup>. Alterações da barreira intestinal também podem ocorrer em situações em que exista diminuição da oferta de oxigênio, como hipotensão, choque ou uso de vasodilatadores que diminuem a perfusão intestinal<sup>42,44,55,60</sup>.

Existem observações clínicas e experimentais que indicam o intestino como o reservatório para bacteremia e endotoxemia em pacientes gravemente enfermos<sup>36,50</sup>.

O papel do intestino não é apenas servir como fonte de bactérias e toxinas, mas também ativar o sistema imunológico local com a produção de citocinas e outros

mediadores imuno-inflamatórios. Esses mediadores intestinais podem induzir a resposta inflamatória sistêmica, que potencialmente pode levar ao aumento da permeabilidade intestinal, criando assim um ciclo vicioso que perpetua a liberação dos mediadores tóxicos<sup>18,52,56,73</sup>. Essas evidências levaram BORDER et al.<sup>13</sup> a criar o termo "estado séptico intestinal" e MARSHALL et al.<sup>52</sup> a definir o intestino como "abscesso não drenado" na disfunção de múltiplos órgãos. CARRICO et al.<sup>18</sup> definiram o intestino como o "motor" dessa disfunção, porém SWANK & DEITCH<sup>73</sup> concluíram que o sistema imuno-inflamatório é o verdadeiro "motor" dessa síndrome, enquanto o intestino é um dos principais "pistões" que impulsionam esse "motor".

Translocação bacteriana é um evento facilmente compreensível quando está associada a ulcerações da mucosa intestinal. Os microrganismos simplesmente passam através das áreas lesionadas do epitélio, penetrando diretamente na lâmina própria<sup>2</sup>. Porém, o mecanismo exato pelo qual as bactérias presentes na luz intestinal chegam viáveis aos linfonodos mesentéricos e à circulação sistêmica, através da mucosa intestinal íntegra, ainda não foi totalmente definido<sup>77</sup>. Apesar de uma maior população bacteriana localizada no cólon, translocação bacteriana ocorre principalmente no intestino delgado<sup>76</sup>. Alguns autores acreditam que as bactérias e/ou endotoxinas se fixam nas células epiteliais, penetram na lâmina própria, onde são avidamente fagocitadas por macrófagos e por eles transportadas através dos canais linfáticos para os linfonodos mesentéricos, ou através dos vasos sanguíneos para o fígado ou outros órgãos. As bactérias chegam viáveis até os linfonodos mesentéricos por falha do macrófago em digerir as bactérias fagocitadas<sup>2,75</sup>.

Basicamente são três os fatores responsáveis pela ocorrência de translocação bacteriana: alteração da microflora intestinal normal; alteração nos mecanismos de defesa do hospedeiro e fatores que levam à injúria da barreira intestinal<sup>3,30,32</sup>. A não ocorrência de translocação bacteriana em animais e seres humanos sadios deve-se à presença da barreira intestinal íntegra, à microflora intestinal normal e ao estado imunológico competente do hospedeiro.

Em relação às lesões da mucosa intestinal na obstrução biliar extra-hepática, existem relatos de ausência de lesões, com mucosa intestinal histologicamente preservada<sup>62</sup>. Outros estudos mostram, porém, a presença de alterações histológicas em íleo terminal. Alguns autores acreditam que essas alterações são puramente descritivas, sem papel importante na ocorrência de translocação bacteriana<sup>22</sup>. Entretanto, outros relatam que essas alterações podem contribuir em parte para que ocorra translocação bacteriana em vigência de ligadura do ducto biliar comum. As alterações mais freqüentes são edema subepitelial das vilosidades intestinais<sup>32,72</sup>, aumento do número de figuras de mitose<sup>22</sup>, dilatação de vasos linfáticos e aumento de células epiteliais no estroma<sup>37</sup>.

Um fator de fundamental importância para translocação bacteriana em obstrução biliar extra-hepática parece ser a ausência de bile, e, conseqüentemente, de sais biliares na luz intestinal. Sabe-se que a bile de ratos apresenta uma concentração de cerca de 90% de Ig A<sup>17,32</sup>. A Ig A secretória tem como principal ação ligar-se aos patógenos intraluminares, e impedi-los de aderirem-se ao epitélio e penetrarem na célula epitelial<sup>14,46</sup>. Já os sais biliares previnem a endotoxemia, por

aderirem-se à endotoxina intraluminal e formarem complexos detergentes de difícil absorção, que são eliminados nas fezes<sup>32</sup>. A ausência de bile intraluminal pode ser responsável pelos distúrbios que ocorrem no equilíbrio da microflora nativa, uma vez que ela pode inibir o crescimento bacteriano, tanto *in vitro* como *in vivo*<sup>58</sup>.

No estudo de SLOCUM et al.<sup>72</sup>, foi avaliado se ausência de bile na luz intestinal promoveria translocação bacteriana. Um dos grupos foi submetido à ligadura do ducto biliar comum, e outro, à derivação colédoco-vesical. A incidência de translocação bacteriana foi similar entre os dois grupos. Isso demonstra que não seria a obstrução biliar, mas sim a ausência de bile na luz intestinal que causaria lesão da mucosa intestinal e translocação bacteriana.

Em relação ao desequilíbrio da microflora intestinal nativa, em associação à obstrução biliar extra-hepática, vários estudos tentam associar esse distúrbio como um fator a mais, que pode colaborar para aumentar a incidência de translocação bacteriana. Existem relatos de alterações qualitativas da população bacteriana de ceco de ratos submetidos a ligadura do ducto biliar comum que apresentam aumento do número de bacilos Gram-negativos, com diminuição do número de *Lactobacilli*<sup>32,37,57</sup>. Por outro lado, existem estudos de avaliações do número de bacilos Gram-negativos no ceco de ratos submetidos a obstrução biliar extra-hepática que não apresentam aumento estatisticamente significativo do número de bactérias, em relação a ratos sem ligadura do ducto biliar<sup>15,62,72</sup>.

PARKS et al.<sup>58</sup> relataram ausência de alterações no equilíbrio da microflora intestinal no intestino delgado de ratos submetidos a ligadura do ducto biliar comum.

O mesmo achado foi evidenciado no presente estudo, exceto quando foram comparados os ratos dos grupos 14D *versus* Simulação.

Existem algumas substâncias que, quando usadas na vigência de obstrução biliar extra-hepática, através de diferentes mecanismos de ação, promovem redução no índice de translocação bacteriana. Lactulose, um dissacarídeo semi-sintético, que é usada para tratamento de constipação e encefalopatia hepática, quando utilizada em modelos experimentais de oclusão biliar extra-hepática, mostrou uma redução na translocação bacteriana. A enzima  $\beta$ -galactosidase, encontrada em *Escherichia coli*, degrada a lactulose em lactato e piruvato, reduzindo o pH cecal. A diminuição do pH cecal diminui a colonização de bactérias Gram-negativas, e, conseqüentemente, a endotoxemia. Aparentemente, a lactulose possui um valioso efeito em prevenir endotoxemia<sup>57</sup>.

Outra substância que pode reduzir translocação em vigência de ligadura do ducto biliar comum é o alupurinol, um inibidor competitivo da xantina-oxidase. A xantina-oxidase é originada da conversão da xantina-dehidrogenase, causando uma peroxidação de lipídeos da mucosa intestinal. A mucosa intestinal é um dos locais com maior quantidade de xantina-oxidase. Essa peroxidação causa atrofia intestinal e, posteriormente, ativação de neutrófilos polimorfonucleares. O alupurinol inibe competitivamente a xantina-oxidase, reduzindo a translocação bacteriana, por reduzir a peroxidação dos lipídeos da mucosa intestinal. O seu papel clínico é apenas especulativo, porque ratos são muito diferentes de seres humanos em relação à

distribuição da xantina-oxidase. Porém, essa substância merece ser estudada melhor<sup>69,70</sup>.

Teoricamente, translocação bacteriana pode ser inibida por ativação dos macrófagos da mucosa intestinal, induzindo o aumento da capacidade de fagocitose<sup>38</sup>. Uma substância que causa essa ativação é o Muramil Tripeptídeo Fosfatidiletolamina (MTF.), um derivado do Muramil Dipeptídeo, conhecido potente agente de ativação macrofágica. DING et al.<sup>38</sup> utilizaram MTF via oral em ratos com obstrução biliar comum, e observaram uma redução no índice de translocação bacteriana, de 40% para 0%, quando compararam-se ratos com obstrução biliar extra-hepática usando placebo, e ratos com ligadura do ducto biliar comum usando MTF.

A endotoxemia tem sido alvo de intensas pesquisas, principalmente no que se refere à ativação de citocinas pró-inflamatórias e ocorrência de Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica. A endotoxemia é induzida pela disseminação de componentes lipopolissacarídicos do revestimento de bactérias Gram-negativas. Por isso o termo LPS passou a ser de uso corrente, e sinônimo de endotoxina<sup>1,41,43</sup>.

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<sup>1</sup>. As moléculas de endotoxinas formam uma rígida armadura, protegendo as bactérias Gram-negativas dos efeitos adversos do meio externo e também da ação de antibióticos<sup>43</sup>. Em modelos experimentais, obstrução biliar extra-hepática reduz a resposta imunológica e suprime a imunidade celular específica.

Fatores como hiperbilirrubinemia e níveis elevados de ácidos biliares foram considerados responsáveis por essas alterações imunológicas. GREVE<sup>41</sup> et al., utilizando ratos convencionais e ratos livres de bactérias, submetidos a ligadura do ducto biliar comum, confirmaram a presença de supressão da imunidade celular. Porém, apesar de os níveis de hiperbilirrubinas serem similares, supressão da imunidade não ocorreu nos ratos livres de bactérias, que apresentaram níveis muito baixos de endotoxinas e ausência de bactérias no trato gastrointestinal, indicando que endotoxinas derivadas do intestino têm um papel crucial na supressão da imunidade celular. Além disso, administração subcutânea de endotoxinas nesses ratos livres de bactérias resultou em supressão da imunidade celular, similar à encontrada em ratos convencionais com ligadura do ducto biliar comum.

No presente estudo, endotoxemia foi detectada em todos os grupos, com exceção dos grupos Simulação e Controle. O aumento foi diretamente proporcional ao tempo de ligadura do ducto biliar comum, com diferenças estatisticamente significantes entre os grupos. CLEMENTS et al.<sup>22</sup> observaram resultados semelhantes, também com diferenças estatisticamente significantes, quando compararam ratos com 3 semanas de obstrução de ducto biliar comum com ratos submetidos à simulação de ligadura do ducto. Esses autores concluíram que o tempo de duração da obstrução biliar extra-hepática aumenta os níveis de endotoxinas circulantes.

O TNF $\alpha$  é o principal mediador da resposta do hospedeiro frente a bactérias Gram-negativas e outros agentes infecciosos<sup>1</sup>. O TNF é sintetizado sob duas formas: o TNF $\alpha$  e o TNF $\beta$ , também conhecido como linfotoxina. O TNF $\alpha$  é produzido por

vários tipos de células, mas sua maior fonte biológica são os fagócitos mononucleares, que o produzem quando estimulados por LPS<sup>1,41</sup>. Portanto, TNF $\alpha$  é um mediador importante da toxicidade das endotoxinas.

Neste estudo, TNF $\alpha$  foi detectado em todos os grupos, com exceção dos ratos dos grupos Simulação e Controle. Da mesma forma que a endotoxemia, apresentou um aumento proporcional ao tempo de obstrução biliar, comprovando que, quanto maior foi o nível de endotoxinas circulantes, maior foi o estímulo dessa endotoxina sobre os macrófagos, e, conseqüentemente, maior a produção de TNF $\alpha$ . Houve diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos comparados. Os mesmos achados foram também demonstrados por REYNOLDS et al.<sup>61</sup>, que observaram aumento dos níveis de TNF circulante em ratos submetidos à obstrução biliar extra-hepática.

O Sistema Reticuloendotelial (SRE) é composto de macrófagos fixos e livres que, entre outras funções, são responsáveis pelo clareamento de partículas estranhas do sangue<sup>10,71</sup>, como, por exemplo, bactérias. A grande maioria do SRE está localizada no fígado e no baço, que conseguem remover cerca de 95% das bactérias circulantes<sup>10</sup>. Disfunção nesse sistema pode causar aumento na incidência de infecções, observadas em pacientes com icterícia obstrutiva<sup>10,11</sup>. Estudos realizados em coelhos e ratos, com ligadura do ducto biliar comum, mostram disfunção do SRE, que se inicia precocemente e pode persistir até 6 meses após a resolução da obstrução biliar. Essa disfunção pode ser por defeito na morte

intracelular da bactéria, uma diminuição na “entrega” de bactérias às células retículo-endoteliais, ou uma combinação desses fatores<sup>10,71,74</sup>.

Em todos os grupos, as culturas dos *swabs* dos esfregaços do retroperitônio foram negativas, o que demonstra não ter havido contaminação dos órgãos dos ratos que apresentaram translocação bacteriana, com possíveis bactérias existentes na cavidade abdominal. O mesmo aspecto foi observado por CLEMENTS et al.<sup>22</sup> e CAKMAKCI et al.<sup>15</sup>

Em relação à translocação bacteriana qualitativa, este estudo demonstrou positividade em todos os grupos, com exceção do grupo Controle, onde não ocorreu translocação para nenhum rato. No grupo Simulação, observou-se translocação bacteriana em 28,57% dos ratos. Essa bacteremia, que ocorreu após manipulação e simulação da ligadura do ducto biliar comum, também foi encontrada por outros autores<sup>22,32</sup>. Nos ratos dos grupos com ligadura do ducto biliar comum, houve um aumento da incidência de translocação bacteriana relacionada com o aumento do tempo de obstrução biliar extra-hepática. Resultados semelhantes foram observados por diversos autores<sup>22,32,37,62</sup>

Também observou-se aumento no número de órgãos com translocação bacteriana, relacionado ao tempo de ligadura do ducto biliar comum, demonstrando maior intensidade na passagem de bactérias viáveis quanto maior foi o tempo de obstrução. Essa maior intensidade foi mais evidente no grupo 14D, onde observou-se translocação bacteriana para órgãos como rins, e hemocultura positiva, o que não ocorreu nos outros grupos.

Quando comparou-se a quantidade de bactérias translocadas, a maior intensidade de translocação no grupo 14D tornou-se mais evidente. Em relação à quantidade de bactérias translocadas para rins, baço e fígado, encontraram-se diferenças estatisticamente significantes apenas no grupo 14D. Nos demais grupos, não houve diferenças estatísticas quando os grupos foram comparados entre si.

Em relação à quantidade de bactérias translocadas para linfonodos mesentéricos, observou-se um aumento do seu número, relacionado diretamente ao tempo de obstrução biliar, apresentando diferenças estatisticamente significantes entre os grupos, com exceção das comparações entre os grupos Simulação e 1D, Simulação e 2D, Controle e 1D, 2D e 7D, e 7D e 14D, que não apresentaram diferenças estatisticamente significantes.

Provavelmente não exista um fator isolado que cause translocação bacteriana em ratos com obstrução biliar extra-hepática, mas sim, uma somação de fatores que, atuando em conjunto, provoquem esse fenômeno. A ausência de bile na luz intestinal, que pode causar desequilíbrio na flora intestinal nativa provocando um aumento de bactérias Gram-negativas, alterações histológicas do íleo terminal, que podem estar presentes ou não, e diminuição da função do sistema reticuloendotelial, encontrada em ratos com obstrução biliar extra-hepática, parecem ser os principais eventos envolvidos no aumento dos índices de translocação bacteriana nesses ratos. Outros fatores, como maior tempo de obstrução biliar, níveis mais elevados de endotoxinas e TNF $\alpha$  circulantes contribuem para que esses índices de translocação bacteriana sejam maiores.



Após análise dos resultados do presente estudo podemos concluir que:

- 1 - Obstrução biliar extra-hepática predispõe translocação bacteriana.
- 2 - Obstrução biliar extra-hepática causou aumento nos níveis de endotoxinas circulantes.
- 3 - Obstrução biliar extra-hepática causou aumento nos níveis de TNF $\alpha$  circulante.
- 4 - Quanto maior foi o tempo de obstrução biliar extra-hepática, maior foi o número de ratos com translocação bacteriana, o número de órgãos com translocação bacteriana, o nível de endotoxemia e o nível de TNF $\alpha$  circulante.



**TABELA 6:** DOSAGENS DE BILIRRUBINAS, ENDOTOXINAS E TNF $\alpha$  NOS RATOS DO GRUPO 1D

Grupo	Rato	Bilirrubinas Totais (mg/dl)	Endotoxina (UE/ml)	TNF $\alpha$ (Pg/ml)
1D	1	7,46	0	0
	2	7,09	0,07	136
	3	8,61	0,016	263
	4	5,31	0	0
	5	8,84	0	145
	6	5,45	0	316
	7	5,67	0,08	416
	8	6,78	0	281
	9	5,92	0	0
	10	8,64	0	176

**TABELA 7:** DOSAGENS DE BILIRRUBINAS, ENDOTOXINAS E TNF $\alpha$  NOS RATOS DO GRUPO 2D

Grupo	Rato	Bilirrubinas Totais (mg/dl)	Endotoxina (UE/ml)	TNF $\alpha$ (Pg/ml)
2D	1	3,82	0,17	726
	2	3,98	0,36	1026
	3	6,61	0,29	618
	4	3,6	0,11	716
	5	4,88	0,17	1018
	6	4,93	0,13	1126
	7	6,51	0,15	723
	8	3,58	0,14	816
	9	3,83	0,16	817

**TABELA 8:** DOSAGENS DE BILIRRUBINAS, ENDOTOXINAS E TNF $\alpha$  NOS RATOS DO GRUPO 7D

Grupo	Rato	Bilirrubinas Totais (mg/dl)	Endotoxina (UE/ml)	TNF $\alpha$ (Pg/ml)
7D	1	4,25	0,53	1531
	2	5,28	0,72	1360
	3	6,48	0,81	1101
	4	6,60	0,35	975
	5	4,82	0,27	921
	6	4,10	0,83	1043
	7	4,15	0,59	716
	8	6,30	0,24	1213
	9	5,38	0,22	1140

**TABELA 9:** DOSAGENS DE BILIRRUBINAS, ENDOTOXINAS E TNF $\alpha$  NOS RATOS DO GRUPO 14 D.

Grupo	Rato	Bilirrubinas Totais (mg/dl)	Endotoxina (UE/ml)	TNF $\alpha$ (Pg/ml)
14 D	1	5,18	0,89	2150
	2	6,19	0,73	2818
	3	10,04	0,63	1846
	4	4,54	0,74	1768
	5	4,76	0,51	2136
	6	5,81	0,39	2317
	7	4,27	0,74	1786
	8	5,75	0,83	1684
	9	4,38	0,91	2310
	10	4,02	0,84	2418

**TABELA 10:** DOSAGENS DE BILIRRUBINAS, ENDOTOXINAS E TNF $\alpha$  NOS RATOS DO GRUPO CONTROLE

Grupo	Rato	Bilirrubinas Totais (mg/dl)	Endotoxina (UE/ml)	TNF $\alpha$ (Pg/ml)
Controle	1	0,27	0	0
	2	0,32	0	0
	3	0,73	0	0
	4	0,91	0	0
	5	0,57	0	0
	6	0,53	0	0
	7	0,81	0	0
	8	0,29	0	0
	9	0,75	0	0
	10	0,80	0	0

**TABELA 11:** DOSAGENS DE BILIRRUBINAS, ENDOTOXINAS E TNF $\alpha$  NOS RATOS DO GRUPO SIMULAÇÃO

Grupo	Rato	Bilirrubinas Totais (mg/dl)	Endotoxina (UE/ml)	TNF $\alpha$ (Pg/ml)
Simulação	1	0,39	0	0
	2	0,56	0	0
	3	1,0	0	0
	4	0,65	0	0
	5	0,50	0	0
	6	0,39	0	0
	7	0,48	0	0

**TABELA 12: ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA QUALITATIVA**

<b>GRUPOS</b>	<b>p – valor</b>	<b>Significância</b>
1D X 2D	0,1789	Sem significância
1D X 7D	0,0031	Com significância
1D X 14D	0,0031	Com significância
1D X Simulação	0,1000	Sem significância
2D X 7D	0,2059	Sem significância
2D X 14D	0,0867	Sem significância
2D X Simulação	0,3147	Sem significância
7D X Simulação	0,0048	Com significância
14D X Simulação	0,0034	Com significância
1D X Controle	0,2105	Sem significância
2D X Controle	0,0031	Com significância
7D X Controle	0,000	Com significância
14D X Controle	0,000	Com significância
Simulação X Controle	0,1544	Sem significância

**TABELA 13: ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO ÀS BILIRRUBINAS**

<b>Grupos</b>	<b>n</b>	<b>Soma dos Ranks</b>
1D	10	45,0000
2D	9	233,0000
7D	9	301,0000
14D	10	331,0000
Controle	10	94,5000
Simulação	7	76,5000

p valor = 0,0000

**TABELA 14: ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO À ENDOTOXINA**

<b>Grupos</b>	<b>n</b>	<b>Soma dos Ranks</b>
1D	10	55,0000
2D	9	142,0000
7D	9	228,5000
14D	10	315,5000

p = 0,0000

**TABELA 15:** ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO AO TNF $\alpha$ 

Grupos	n	Soma dos Ranks
1D	10	55,0000
2D	9	150,5000
7D	9	200,5000
14D	10	335,0000

p = 0,0000

**TABELA 16:** ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA QUANTITATIVA DE *Escherichia coli* PARA BAÇO

Grupos	n	Soma dos Ranks
1D	10	24,0000
2D	9	24,0000
7D	9	32,3333
14D	10	38,5000
Controle	10	24,0000
Simulação	7	24,0000

p valor = 0,0018

**TABELA 17:** ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA QUANTITATIVA DE *Escherichia coli* PARA RINS

Grupos	n	Soma dos Ranks
1D	10	25,0000
2D	9	25,0000
7D	9	25,0000
14D	10	41,5000
Controle	10	25,0000
Simulação	7	25,0000

p valor = 0,0000

**TABELA 18:** ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA QUANTITATIVA DE *Escherichia coli* PARA FÍGADO

Grupos	n	Soma dos Ranks
1D	10	20,0000
2D	9	28,6667
7D	9	28,2222
14D	10	48,8000
Controle	10	20,0000
Simulação	7	20,0000

p valor = 0,0000

**TABELA 19:** ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA QUANTITATIVA DE *Escherichia coli* PARA LINFONODOS MESENTÉRICOS

Grupos	n	Soma dos Ranks
1D	10	19,1500
2D	9	31,2222
7D	9	38,2222
14D	10	44,8000
Controle	10	13,5000
Simulação	7	20,0714

p valor = 0,0000

**TABELA 20:** ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA QUANTITATIVA DE *Enterococcus faecalis* PARA BAÇO

Grupos	n	Soma dos Ranks
1D	10	27,0000
2D	9	27,0000
7D	9	27,0000
14D	10	32,5000
Controle	10	27,0000
Simulação	7	27,0000

p valor = 0,1025

**TABELA 21:** ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA QUANTITATIVA DE *Enterococcus faecalis* PARA RINS

Grupos	n	Soma dos Ranks
1D	10	26,5000
2D	9	26,5000
7D	9	26,5000
14D	10	34,7500
Controle	10	26,5000
Simulação	7	26,5000

p valor = 0,0155

**TABELA 22:** ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA QUANTITATIVA DE *Enterococcus faecalis* PARA FÍGADO

Grupos	n	Soma dos Ranks
1D	10	26,0000
2D	9	26,0000
7D	9	26,0000
14D	10	37,0000
Controle	10	26,0000
Simulação	7	26,0000

p valor = 0,0019

**TABELA 23:** ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GRUPOS EM RELAÇÃO A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA QUANTITATIVA DE *Enterococcus faecalis* PARA LINFONODOS MESENTÉRICOS

Grupos	n	Soma dos Ranks
1D	10	24,5000
2D	9	36,5556
7D	9	35,7778
14D	10	26,1000
Controle	10	19,5000
Simulação	7	26,8571

p valor = 0,0325

**TABELA 24:** NÚMERO MÉDIO DE BACTÉRIAS DA ESPÉCIE *Escherichia coli* POR GRUPO, NO FRAGMENTO DE INTESTINO DELGADO

<b>Grupos</b>	<b>n</b>	<b>Número médio de bactérias</b>
1D	10	13410,51
2D	9	14228,64
7D	9	13580,66
14D	10	27891,15
Controle	10	15886,56
Simulação	7	17767,78

p valor = 0,0163

**TABELA 25:** NÚMERO DE BACTÉRIAS DA ESPÉCIE *Enterococcus faecalis* POR GRUPO, NO FRAGMENTO DE INTESTINO DELGADO

<b>Grupos</b>	<b>n</b>	<b>Número médio de bactérias</b>
1D	10	7152,13
2D	9	8077,01
7D	9	7162,97
14D	10	18565,21
Controle	10	7933,03
Simulação	7	6016,70

p valor = 0,0029

---

## **Referências Bibliográficas**

---

1. ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Cytokines in : Chapter Twelve of **Cellular and molecular immunology**. Second Edition. W.B. Saunders. 240-260. 1994.
2. ALEXANDER, J. W. Nutrition and translocation. **JPEN J. Parent. Enteral Nutr.** Silver Spring, v. 14, n. 5S p. 170S-174S, Sep-Oct. 1990.
3. ALEXANDER, J. W.; BOYCE, S. T.; BABCOCK, G. F. et al. The process of microbial translocation. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 212, p. 496-512, Dec. 1990.
4. ALEXANDER, J. W.; GIANOTTI, L.; PYLES, T.B. et al. Distribution and survival of Escherichia coli translocating from the intestine after thermal injury. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 213, n. 6, p. 558-567, June 1991.
5. ALVERDY, J. C. Effects of glutamine-supplemented diets on immunology of the gut. **JPEN J. Parenter. Enteral Nutr.**, Silver Spring, v. 14, 4 suppl., p. 109S-113S, Jul-Aug. 1990.
6. ALVERDY, J. C.; AOYS, E. The effect of glucocorticoid administration on bacterial translocation: evidence for an acquired mucosal immunodeficient state. **Ann. Surg.** Philadelphia, v. 214, n. 6, p. 719-723, Dec. 1991.
7. ALVERDY, J. C.; AOYS, E.; MOSS, G. S. Total parenteral nutrition promotes bacterial translocation from the gut. **Surgery**, St Louis, v.104, p. 185-190, Aug. 1988.
8. ARMSTRONG, C. P.; DIXON, J. M.; TAYLOR, T. V. et al. Surgical experience of deeply jaundiced patients with bile duct obstruction. **Br. J. Surg.**, London, v. 71, n. 3, p. 234-238, Mar. 1984.
9. BAKER, J. W.; DEITCH, E. A.; BERG, R. D. et al. Hemorrhagic shock induces bacterial translocation from the gut. **J. Trauma**, Baltimore, v. 28, n. 7, p. 896-906, July 1988.
10. BALL, S. K.; GROGAN, J. B.; COLLIER, B. J. et al. Bacterial phagocytosis in obstructive jaundice: a microbiologic and electron microscopic analysis. **Am. Surg.**, Atlanta, v. 57, n. 2, p.67-72, Feb. 1991.
11. BAYER, I.; ELLIS, H. Jaundice and wound healing: an experimental study. **Br. J. Surg.**, London, v. 63, p. 392-396, 1976.
12. BERG, R. D.; GARLINGTON, A. W. Translocation of certain indigenous bacteria from the gastro-intestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. **Infec. Immun.**, Washington, v. 23, p. 403-411, Feb. 1979.
13. BORDER, J. R.; HASSETT, J.; LADUCA, J. et al. The gut origin septic states in blunt trauma (ISS=40) in the ICU. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 206, p. 427-448, Oct. 1987.

14. BRANDTZAEG, P.; HALSTENSEN, T. S.; KETT, K. et al. Immunobiology and immunopathology of human gut mucosa: humoral immunity and intraepithelial lymphocytes. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 97, n. 6, p. 1562-1584, Dec. 1989.
15. CAKMAKCI, M.; TIRNAKSIZ, B.; HAYRAN, M. et al. Effects of obstructive jaundice and external biliary diversion on bacterial translocation in rats. **Eur. J. Surg.**, Oslo, v. 162, p. 567-571, 1996.
16. CAMPOS, A. C. L. **Translocação bacteriana em ratos recebendo nutrição parenteral**. Curitiba, 1992. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica)- Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
17. CAPPELLER, W. A.; BLOCH, K. J.; HATZ, R. A. et al. Reduction in biliary IgA after burn injury: role of diminished delivery via the thoracic duct and of enhanced loss from the systemic circulation. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 215, n. 4, p.338-343, Apr. 1992.
18. CARRICO, C. J.; MEAKINS, J. L.; MARSHALL, J. C. ET AL. Multiple-organ-failure syndrome. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 121, p. 196-208. Feb. 1986.
19. CHUANG, J. H.; CHEN, W. J.; LO, S. K. et al. Adverse metabolic and microbiological effects of tube feeding in experimental canine obstructive jaundice. **JPEN J. Parent. Enteral Nutr.**, Silver Spring, v. 21, n. 1, p.36-40, Jan-Feb. 1997.
20. CHUANG, J. H.; SHIEH, C. S.; CHANG, N. K. et al. Role of parenteral nutrition in preventing malnutrition and decreasing bacterial translocation to liver in obstructive jaundice. **World J. Surg.**, New York, v. 17, n. 5, p.580-586, Sep-Oct. 1993.
21. CLEMENTS, W. D. B.; HALLIDAY, M. I.; McCAIGUE, M. D. et al. Effects of extrahepatic obstructive jaundice on Kupffer cell clearance capacity. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 128, p. 200-205, Feb. 1993.
22. CLEMENTS, W. D. B.; PARKS, R. W.; ERWIN, P. et al. Role of the gut in the pathophysiology of extrahepatic biliary obstruction. **Gut**, London, v. 39, p. 587-593, 1996.
23. DEITCH, E. A. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 125, p. 403-404, Mar. 1990.
24. DEITCH, E. A. Bacterial translocation: is it of clinical significance? **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 98, p. 243-244, Jan. 1990.
25. DEITCH, E. A. Multiple organ failure: pathophysiology and potential future therapy. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 216, n. 2, p. 117-134, Aug. 1992.

26. DEITCH, E. A.; BERG, R.D. Endotoxin but not malnutrition promotes bacterial translocation of the gut flora in burned mice. **J. Trauma**, Baltimore, v. 27, p. 161-166, Feb. 1987.
27. DEITCH, E. A.; BERG, R.D.; SPECIAN, R. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 122, p. 185-190, Feb. 1987
28. DEITCH, E. A.; BRIDGES, W. M.; MA, J. W. et al. Obstructed intestine as a reservoir for systemic infection. **Am. J. Surg.**, Newton, v. 159, p. 394-401, Apr. 1990.
29. 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.**, v. 40, n.2, p. 99-104. 1993.
30. DEITCH, E. A.; MA, L.; MA, W. J. et al. Inhibition of endotoxin-induced bacterial translocation in mice. **J. Clin. Invest.**, New York, v. 84, p. 36-42, July 1989.
31. DEITCH, E. A.; MAEJIMA, K.; BERG, R. Effect of oral antibiotics and bacterial overgrowth on the translocation of the GI tract microflora in burned rats. **J. Trauma**, Baltimore, v. 25, p. 385-392, May. 1985.
32. DEITCH, E. A.; SITTING, K.; LI, M. et al. Obstructed jaundice promotes bacterial translocation from the gut. **Am. J. Surg.**, Newton, v. 159, p.79-84, Jan. 1990.
33. 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. **Crit Care Med.**, Baltimore, v. 19, n. 6, p. 785-791, June 1991.
34. DEITCH, E. A.; WINTERTON, J.; BERG, R. Effect of starvation, malnutrition, and trauma on the gastrointestinal tract flora and bacterial translocation. **Arch. Surg.** Chicago, v.122, p. 1019-1024, Dec. 1987.
35. DEITCH, E. A.; WINTERTON, J.; BERG, R. Thermal injury promotes bacterial translocation from the gastrointestinal tract in mice with impaired T-cell-mediated immunity. **Arch. Surg.**, Chicago, v.121, p. 97-101, Jan. 1986.
36. DEITCH, E. A.; WINTERTON, J.; LI, M. et al. The gut as a portal of entry for bacteremia: role of protein malnutrition. **Ann. Surg.**, Philadelphia , v. 205, n. 6, p. 681-692, June 1987.
37. DING, J. W.; ANDERSSON, R.; SOLTESZ, V. et al. Obstructive jaundice impairs reticulo endothelial function and promotes bacterial translocation in rats. **J. Surg. Res.**, San Diego, v. 57, n. 2, p. 238-245, Aug. 1994.

38. DING, J. W.; ANDERSSON, R.; SOLTESZ, V. L. et al. Inhibition of bacterial translocation in obstructive jaundice by muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine in the rat. **J. Hepatol.**, Copenhagen, v. 20, p. 720-728, 1994.
39. ELEFThERIADIS, E.; KOTZAMPASSI, K.; PAPANOTAS, K. et al. Gut ischemia, oxidative stress, and bacterial translocation in elevated abdominal pressure in rats. **World J. Surg.**, New York, v. 20, n. 1, p. 11-16, Jan.-Feb. 1996.
40. GOOR, H. Van; ROSMAN, C.; GROND, J. et al. Translocation of bacteria and endotoxin in organ donors. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 129, p. 1063-1066, Oct. 1994.
41. GREVE, J. W.; GOUMA, D. J.; SOETERS, P. B. et al. Suppression of cellular immunity in obstructive jaundice is caused by endotoxins: a study with germ-free rats. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 98, p. 478-485, Feb. 1990.
42. HARRIS, M. T.; LEWIS, B. S. Systemic diseases affecting the mesenteric circulation. **Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 72, n. 1, p. 245-259, Feb. 1992.
43. 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.
44. KALEYA, R. N.; SAMMARTANO, R. J.; BOLEY, S. J. Aggressive approach to acute mesenteric ischemia. **Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.72, n. 1, p. 157-182, Feb. 1992 .
45. LAMBERT, R. Surgery of the intestine : anatomy. In:\_\_\_\_\_. **Surgery of the digestive system in the rat**. Illinois : Charles C.Thomas, 1965, p.389-395.
46. LANGKAMP-HENKEN, B.; GLEZER, J. A.; KUDSK, K. A. Immunologic structure and function of the gastrointestinal tract. **Nutr. Clin. Pract.**, Baltimore, v. 7, p. 100-108, 1992.
47. MADDAUS, M. A.; WELLS, C. L.; SIMMONS, R. L. Role of cell-mediated immunity in preventing the translocation of intestinal bacteria. **Surg. Forum**, v. 17, p. 107-109, 1986.
48. MAIJIMA, K.; DEITCH, E. A.; BERG, R. Bacterial translocation from the gastrointestinal tracts of rats receiving thermal injury. **Infect. Immun.** Washington, v. 43, n. 1 , p. 6-10, Jan. 1984.
49. MAIJIMA, K.; DEITCH, E. A.; BERG, R. Promotion by burn stress of the translocation of bacteria from the gastrointestinal tract of mice. **Arch. Surg.**; Chicago, v. 119, p. 166-172, Feb. 1984.

50. MAINOUS, M. R.; TSO, P.; BERG, R. et al. Studies of the route, magnitude, and time course of bacterial translocation in a model of systemic inflammation. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 126, p. 33-37, Jan 1991.
51. MARSHALL, J. C.; CHRISTOU, N. V.; HORN, R. et al. The microbiology of multiple organ failure: the proximal gastrointestinal tract as an occult reservoir of pathogens. **Arch. Surg.**, Chicago. V. 123, p. 309-315, Mar. 1988.
52. MARSHALL, J. C.; CHRISTOU, N. V.; MEAKINS, J. L. The gastrointestinal tract: the "undrained abscess" of multiple organ failure. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 218, n. 2, p. 110-119, Aug. 1993.
53. MARTINS, E. L. **Efeito do tempo da isquemia sobre a translocação bacteriana em ratos com isquemia segmentar do cólon descendente.** Curitiba, 1997. Tese (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
54. McMANUS, J. P. A.; ISSELBACHER, K. J. Effect of fasting versus feeding on the rat small intestine: morphological, biochemical and functional differences. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 59, n. 2, p. 214-221, Aug. 1970.
55. MITSUDO, S.; BRANDT, L. J. Pathology of intestinal ischemia. **Surg. Clin. North Am.** Philadelphia, v. 72, n. 1, p. 43-63, Feb. 1992.
56. NIEUWENHUIJZEN, G. A. P.; DEITCH, E. A.; GORIS, J.A. Infection, the gut and the development of the multiple organ dysfunction syndrome. **Eur. J. Surg.**, Oslo, v. 162, p. 259-273, 1996.
57. ÖZASLAN, C.; TÜRKÇAPAR, A. G.; KESENCI, M. et al. Effect of lactulose on bacterial translocation. **Eur. J. Surg.**, Oslo, v. 163, p. 463-467, 1997.
58. PARKS, R. W.; CLEMENTS, W. D. B.; POPE, C. et al. Bacterial translocation and gut microflora in obstructive jaundice. **J. Anat.**, London, v. 189, p. 561-565, 1996.
59. PARKS, R. W.; CLEMENTS, W. D. B.; SMYE, M. G. et al. Intestinal barrier dysfunction in clinical and experimental obstructive jaundice and its reversal biliary drainage. **Br. J. Surg.**, London, v. 83, p. 1345-1349, 1996.
60. PATEL, A.; KALEYA, R. N.; SAMMARTANO, R. J. Pathophysiology of mesenteric ischemia. **Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 72, n. 1, p. 31-41, Feb. 1992.
61. REYNOLDS, J. V.; MURCHAN, P.; REDMOND, H. P. et al. Failure of macrophage activation in experimental obstructive jaundice: association with bacterial translocation. **Br. J. Surg.**, London, v. 82, p. 534-538, 1995.
62. REYNOLDS, J. V.; MURCHAN, P.; LEONARD, M. et al. Gut barrier failure in experimental obstructive jaundice. **J. Surg. Res.**, San Diego, v. 62, n. 1, p. 11-16, Apr. 1996.

63. ROMERO,S.; FUENZALIDA,L. **Manejo y uso de animales de laboratorio.** Santiago : Instituto de Salud Publica de Chile, 1991. v.1, p.135.
64. ROSCHER, R.; OETTINGER,W.; BERGER, H. G. Bacterial microflora, endogenous endotoxin and prostaglandins in small bowel obstruction. **Am. J. Surg.,** Newton, v. 155, p. 348-355, 1988.
65. RUSH JR, B. F. Irreversibility in hemorrhagic shock is caused by sepsis. **Am Surg.,** Atlanta, v. 55, n. 4, p. 204-208, Apr. 1989.
66. RUSH JR, B. F.; SORI, A., J.; MURPHY, T. F.; et al. endotoxemia and bacteremia during hemorrhagic shock. The link between trauma and sepsis. **Ann. Surg.,** Philadelphia, v. 207, p. 549-554, Dec. 1988.
67. SAADIA, R.; SCHEIN, M.; McFARLANE, C. et al. Gut barrier function and the surgeon. **Br. J. Surg.,** v. 77, n. 5, p. 487-492, May 1990.
68. SCHATTEN, W. E.; DESPREZ, J. D.; HOLDEN, W. D. A bacteriologic study of portal-vein blood in man. **Arch. Surg.,** Chicago, v. 71, p. 404-409, 1955.
69. SCHIMPL, G.; PESENDORFER, P.; STEINWENDER, G. et al. Allopurinol reduces bacterial translocation, intestinal mucosal lipid peroxidation, and neutrophil-derived myeloperoxidase activity in chronic portal hypertensive and common bile duct-ligated growing rats. **Pediatr. Res.,** Baltimore, v. 40, n. 3, p. 422-428, 1996.
70. SCHIMPL,G.; PESENDORFER, P.; STEINWENDER, G. et al. Allopurinol and glutamine attenuate bacterial translocation in chronic portal hypertensive and common bile duct ligated growing rats. **Gut,** London, v. 39, p. 48-53, 1996.
71. SCOTT-CONNER, C. E. H.; GROGAN, J. B.; SCHER, K. S. et al. Impaired clearance of Eschirichia coli bacteremia in early biliary obstruction. **Am. J. Surg.,** Newton, v. 157, p. 210-214, Feb. 1989.
72. SLOCUM, M. M.; SITTIG, K. M.; SPECIAN, R. D. et al. Absence of intestinal bile promotes bacterial translocation. **Am. Surg.,** Atlanta, v. 58, n. 5, p.305-310, May. 1992.
73. SWANK, G. M.; DEITCH, E. A. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. **World J. Surg.,** New York, v. 20, n. 4, p. 411-417, May. 1996.
74. VANE, D. W.; REDLICH, P.; WEBER, T. et al. Impaired immune function in obstructive jaundice. **J. Surg. Res.,** San Diego, v. 45,n. 3, p. 287-293, Sep. 1988.
75. WELLS, C. L. Relationship between intestinal microecology and the translocation of intestinal bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek,** Dordrecht, v 58, n. 2, p. 87-93 1990

76. WELLS, C. L.; MADDAUS, M. A.; SIMMONS, R. L. Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. **Rev. Infect. Dis.**; Chicago, v. 10, p. 958-979, 1988.
77. ZENI NETO, C. **Translocação bacteriana em ratos com oclusão intestinal: efeito do nível da oclusão e da isquemia.** Curitiba, 1994. Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde , Universidade Federal do Paraná.