

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

RICARDO ZANETTI GOMES

EFEITO DO ALOPURINOL SOBRE AS REPERCUSSÕES DA  
ISQUEMIA E REPERFUSÃO NOS MEMBROS  
CAUDAIS DE RATOS WISTAR

CURITIBA  
2007

RICARDO ZANETTI GOMES

EFEITO DO ALOPURINOL SOBRE AS REPERCUSSÕES DA  
ISQUEMIA E REPERFUSÃO NOS MEMBROS CAUDAIS DE RATOS  
WISTAR

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

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

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

Coordenador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

CURITIBA  
2007



G633 Gomes, Ricardo Zanetti

Efeito do alopurinol sobre as repercussões da isquemia  
reperfusão nos membros caudais de Ratos Wistar [recurso  
eletrônico] / Ricardo Zanetti Gomes. – Curitiba, 2007.

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

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Coorientador: João Carlos Domingues Repka

1. Alopurinol. 2. Isquemia. 3. Reperfusão. 4. Fator de  
necrose tumoral alfa. 5. Ratos Wistar. I. Matias, Jorge Eduardo  
Fouto. II. Repka, João Carlos Domingues. III. Programa de Pós-  
Graduação em Clínica Cirúrgica. Setor de Ciências da Saúde.  
Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

NLMC: WL356



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

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

**Aluno RICARDO ZANETTI GOMES**

**Título da Tese EFEITO DO ALOPURINOL SOBRE AS REPERCUSSÕES DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO NOS MEMBROS CAUDAIS DE RATOS WISTAR.**

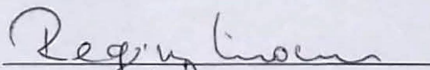
**CONCEITOS EMITIDOS:**

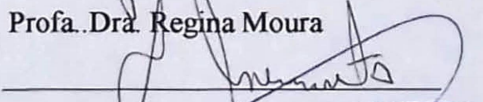
Profa.Dra. Regina Moura	Conceito emitido A	Equivalência 10
Prof.Dr. Cesar Roberto Busato	Conceito emitido A	Equivalência 10
Prof.Dr. Mario Augusto C. da Costa	Conceito emitido A	Equivalência 10
Profa.Dra. Maria Terezinha C.Leão	Conceito emitido A	Equivalência 10
Prof.Dr.Henrique Jorge Stahlke junior	Conceito emitido A	Equivalência 10

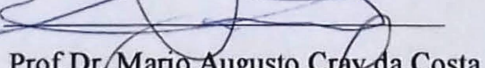
**Conceito Final de Avaliação:**

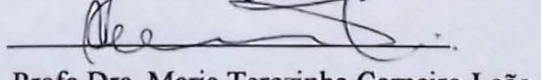
Conceito: A Equivalência: 10

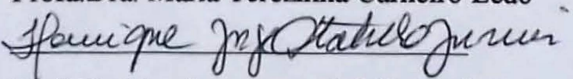
Curitiba, 20 de dezembro de 2007

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Regina Moura

  
\_\_\_\_\_  
Prof.Dr. César Roberto Busato

  
\_\_\_\_\_  
Prof.Dr. Mario Augusto Cray da Costa

  
\_\_\_\_\_  
Profa.Dra. Maria Terezinha Carneiro Leão

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Henrique Jorge Stahlke Júnior

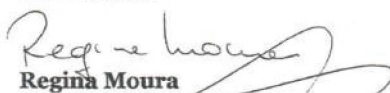
## ATA DE APROVAÇÃO



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

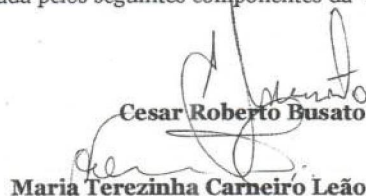
Ata do julgamento da 115ª Tese de Doutorado 436ª do Curso para conclusão do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica, Nível Doutorado da Universidade Federal do Paraná, referente ao aluno **RICARDO ZANETTI GOMES**, com o título EFEITO DO ALOPURINOL SOBRE AS REPERCUSSÕES DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO NOS MEMBROS CAUDAIS DE RATOS WISTAR, sendo na **Linha De Pesquisa: Diagnóstico e Avaliação das Repercussões da Resposta Inflamatória Clínica e Experimental em Cirurgia** **Área De Concentração: Clínica Cirúrgica**, tendo como orientador Prof.Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias.

As sete horas e trinta minutos do dia vinte de dezembro de dois mil e sete, no Auditório do 7º andar do prédio central sala 701 do Hospital de Clínicas, teve início a prova em epígrafe, constituída pela Banca Examinadora os Professores Doutores **Regina Moura, Cesar Roberto Busato, Mario Augusto Cray da Costa, Maria Terezinha Carneiro Leão e Henrique Jorge Stahlke Junior** sendo este último Presidente da Banca. Aberta a sessão foi apresentada pelo **Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias** Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pelo candidato das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da tese, como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora convidou o candidato a apresentar oralmente resumo de sua tese no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pelo candidato, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. O Candidato foi considerado **aprovado** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, o Senhor Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que será assinada pelos seguintes componentes da Banca Examinadora.

  
**Regina Moura**

  
**Mario Augusto Cray da Costa**

  
**Henrique Jorge Stahlke Junior**

  
**Cesar Roberto Busato**

  
**Maria Terezinha Carneiro Leão**



Dedico ao Dr. João Carlos Domingues Repka pela sua paciência e tenacidade na missão de ensinar os caminhos da pesquisa.

Também à minha esposa, Luciana, por todo apoio, amor e compreensão.

Dedico aos meus filhos, Victor e Luisa, pois sua existência é fonte de motivação.

Aos meus pais Antonio Mario e Eni dedico pelo seu exemplo de vida.

## AGRADECIMENTOS

Consigno aqui, os agradecimentos:

- Ao Dr. Jorge Eduardo F. Matias pela oportunidade de convívio e orientação neste estudo.
- Ao Dr. João Carlos Domingues Repka, pelo valioso auxílio, orientação e infindável espírito acadêmico.
- À Universidade Federal do Paraná e ao Departamento de Pós Graduação em Cirurgia, instituição que me acolheu durante a minha formação, minha eterna gratidão.
- Ao Dr. Cesar Roberto Busato por seu estímulo e cumplicidade.
- Ao Dr. Paulo Henrique Stahlke, pelo desenvolvimento do modelo experimental utilizado neste estudo,
- Ao Hospital Angelina Caron local onde foram realizados os experimentos deste estudo, minha gratidão respeito e apreço.
- A bibliotecária Áurea Maria Costin pela sua cuidadosa colaboração
- A todos, que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente, para que este trabalho se efetivasse.

Muito Obrigado.

## RESUMO

**Introdução:** A isquemia é um dos problemas mais frequentes e desafiadores com que os cirurgiões vasculares se deparam e é ao mesmo tempo paradoxal, pois, ao restabelecer o fluxo sanguíneo para um tecido podem ser desencadeadas alterações locais ou sistêmicas mais intensas que a isquemia *per se*. Estas complicações estão relacionadas com liberação de radicais livres de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias.

**Objetivo:** Avaliar a ocorrência de estresse oxidativo após 2 ou 3 horas de isquemia de membros caudais. Verificar se em vigência de estresse oxidativo secundário à isquemia e reperfusão de membros caudais ocorrem endotoxemia, translocação bacteriana e liberação hematogênica de TNF $\alpha$ . Definir os efeitos do alopurinol na vigência de estresse oxidativo secundário à isquemia e reperfusão de membros caudais quanto à ocorrência de endotoxemia, translocação bacteriana e liberação hematogênica de TNF $\alpha$ .

**Método:** Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais do Hospital Angelina Caron sob protocolo 08/04. Foram utilizados 60 ratos Wistar com pesos de  $256,3 \pm 8,48$  gramas separados em dois grupos. O primeiro grupo denominado de grupo controle (C), n= 30, composto por animais tratados com solução fisiológica. O segundo grupo foi composto por ratos tratados com alopurinol, denominado grupo alopurinol (A), n=30. Cada um destes grupos foi subdividido em três subgrupos de 10 ratos sendo que em cada subgrupo foi submetido diferentes tempos de isquemia: 2 horas (C2h e A2h) e 3 horas (C3h e A3h) e os subgrupos simulação os quais não foram submetidos à isquemia (CS e AS). Nos grupos simulação foi procedida laparotomia mediana xifopúbica, dissecação do peritônio parietal posterior e separação da veia cava da aorta infra-renal. Nos grupos isquemia por duas horas, após o procedimento anterior foi instalado um clampe e procedida isquemia por 2 horas e da mesma forma no grupo isquemia por 3 horas. Três dias após foram coletadas amostras de sangue para hemocultura e dosagens de TNF alfa e endotoxina, fragmentos intestinais para dosagem de substâncias redutoras do ácido tiobarbitúrico (TBARS) e rins, fígado, baço e linfonodos mesentéricos para a pesquisa de translocação bacteriana. Utilizou-se o teste de ANOVA e os valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística.

**Resultados:** Foram observadas diminuições nas dosagens de TBARS (nmol/mg de proteína) nos intestinos dos ratos tratados pelo alopurinol após duas e três horas de isquemia  $0,373 \pm 0,038$  e  $0,391 \pm 0,045$ , em relação aos não tratados  $0,720 \pm 0,070$  e  $0,836 \pm 0,053$  ( $p < 0,001$ ); TNF alfa circulante (pg/ml) de  $34,1 \pm 9,3$  e  $280,7 \pm 93,6$  (duas e três horas de isquemia e tratados pelo alopurinol), em relação aos não tratados  $347,1 \pm 101,9$  e  $749,6 \pm 99,6$  ( $p < 0,001$ ); Endotoxinas circulantes (UE/ml) de  $0,0117 \pm 0,02$  e  $0,0195 \pm 0,03$  para os tratados pelo alopurinol após duas e três horas de isquemia e  $0,0429 \pm 0,06$  e  $0,1092 \pm 0,05$  para os não tratados ( $p < 0,001$ ); Taxas de translocação bacteriana de  $0,7 \pm 0,48$  e  $2,4 \pm 0,97$  após isquemia e tratamento e  $0,8 \pm 0,42$  e  $3 \pm 0,67$  para os não tratados.

**Conclusão:** Em relação ao grupo simulação ocorreram aumentos do estresse oxidativo secundário à isquemia e reperfusão de membros caudais, indicados pela lipoperoxidação no intestinal. O estresse oxidativo intestinal induziu endotoxemia, translocação bacteriana e níveis séricos de TNF $\alpha$ . O alopurinol exerceu efeito protetor mas não a completa inibição dos danos causados pela isquemia reperfusão, evidenciados pelas diminuições do estresse oxidativo intestinal, da endotoxemia, da translocação bacteriana e dos níveis séricos de TNF $\alpha$ .

**Palavras-chave:** Alopurinol; Isquemia. Reperfusão. Fator de necrose tumoral alfa Ratos Wistar.



## ABSTRACT

**Introduction:** Ischemia is one of the most frequent and challenging problems that vascular surgeons are faced with, and at the same time it is a paradox because on reestablishing the blood flow to a tissue, local or systemic alterations can be caused that are more intense than the ischemia itself. These alterations have to do with the release of free radicals of oxygen and pro-inflammatory cytokines. **Aim:** To evaluate the effects of allopurinol in the occurrence of intestinal oxidative stress, endotoxemia, bacterial translocation and the release of tumor necrosis factor alpha (TNF) in rats submitted to ischemia and reperfusion of the hind limbs. **Method:** This study was performed after approval by the Ethics Committee on Animal Research under protocol number 08/04. Sixty Wistar rats were used, weighing  $256.3 \pm 8.48$  grams and split into two groups of thirty. The control group (C), was made up of animals treated with physiological solution. The second group was made up of rats treated with allopurinol (A). Each of the groups was divided into three sub-groups of ten rats, with each sub-group being submitted to ischemia for different times: two hours (C2h and A2h), three hours (C3h and A3h) and the simulation sub-groups which were not submitted to ischemia (CS e AS). For the simulation groups there was a procedure of median xyphopubic laparotomy, dissection of the posterior parietal peritoneum and separation of the vena cava of the infra-renal aorta. In the groups submitted to two hours of ischemia, following the previous procedure a clamp was installed and ischemia proceeded for two hours. The three hour ischemia took place in the same way. Three hours later, blood samples were collected for hemoculture and dosages of TNF alpha and endotoxin, intestinal fragments for dosages of substances for reducing thiobarbituric acid (TBARS) and kidneys, liver, spleen and mesenteric lymphonodes for the study of bacterial translocation. The ANOVA test was used and values of  $p < 0.05$  indicate statistical significance. **Results:** Reductions in the dosages of TBARS were observed (nmol/mg of protein) in the intestines of the rats treated with allopurinol after two and three hours of ischemia  $0.373 \pm 0.038$  and  $0.391 \pm 0.045$  when compared to those not treated  $0.720 \pm 0.070$  and  $0.836 \pm 0.053$  ( $p < 0.001$ ); circulating TNF alpha (pg/ml) of  $34.1 \pm 9.3$  and  $280.7 \pm 93.6$  (two and three hours of ischemia and treated with allopurinol) in comparison with those not treated  $347.1 \pm 101.9$  and  $749.6 \pm 99.6$  ( $p < 0.001$ ); circulating endotoxins (UE/ml) of  $0.0117 \pm 0.02$  and  $0.0195 \pm 0.03$  for those treated with allopurinol after two and three hours of ischemia and  $0.0429 \pm 0.06$  and  $0.1092 \pm 0.05$  for those not treated ( $p < 0.001$ ); bacterial translocation rates of  $0.7 \pm 0.48$  and  $2.4 \pm 0.97$  after ischemia and treatment and  $0.8 \pm 0.42$  and  $3 \pm 0.67$  for those not treated. **Conclusion:** In the control group there were increases in the lipoperoxidation in the intestine, endotoxemia, bacterial translocation and the seric levels of TNF $\alpha$  in rats submitted to the ischemia and reperfusion of the hind limbs. When, with the same model, the animals were treated with allopurinol, the findings showed a reduction in intestinal lipoperoxidation, endotoxemia, bacterial translocation and the seric levels of TNF $\alpha$ . Therefore, this study suggests that allopurinol has a protective effect on the injuries caused by ischemia reperfusion, but does not completely inhibit them.

**Key words:** Allpurinol. Ischemia. Reperfusion. Tumor necrosis factor-alpha. Wistar Rats.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS.....	43
FIGURA 2 - DEMONSTRAÇÃO DO ATO CIRÚRGICO : NOS DETALHES (A) LAPAROTOMIA POR INCISÃO MEDIANA XIFOPÚBICA, (B) ABERTURA DE TODOS OS PLANOS DA PAREDE ABDOMINAL E EXPOSIÇÃO DA CAVIDADE ABDOMINAL, (C) DISSECÇÃO DO PERITÔNIO PARIETAL, (D) “MICRO-CLAMP”, (E) CLAMPEAMENTO ÓRTICO.....	67
FIGURA 3 - INOCULAÇÃO POR VIA ORAL. EM DETALHE A SOLUÇÃO DE ALOPURINOL E A SONDA RÍGIDA UTILIZADA PARA INOCULAÇÃO ORAL (A) E A INOCULAÇÃO ORAL DA SOLUÇÃO (B).....	69
FIGURA 4 - MACERAÇÃO DOS COMPRIMIDOS DE ZYLORIC <sup>®</sup> , NO DETALHE (A) COMPRIMIDOS, GRAL E PISTILO, (B) PÓ OBTIDO APÓS A MACERAÇÃO DOS COMPRIMIDOS.....	69
FIGURA 5 - COLETA DE SANGUE POR PUNÇÃO INTRACARDÍACA (A) E SEMEADURA EM MEIO DE CULTURA (B,C).....	71
FIGURA 6 - COLETA DE VÍSCERAS: (A) ABERTURA DO ABDOMEM, (B) LOCALIZAÇÃO DAS VÍSCERAS, (C) RETIRADA E ACONDICIONAMENTO DAS VÍSCERAS (D) IDENTIFICAÇÃO DE CADA VÍSCERA.....	72
FIGURA 7 - COLETA DE SEGMENTOS INTESTINAIS PARA A DOSAGEM DE TBARS.....	73
FIGURA 8 - PROCESSAMENTO DE VÍSCERAS : (A) MATERIAIS A SEREM UTILIZADOS DENTRO DA CABINE DE FLUXO LAMINAR, (B) GRAL, SOLUÇÃO AQUOSA DE PEPTONA A 2% E MEIO DE CULTURA, (C) MACERAÇÃO DA VÍSCERA (D) IDENTIFICAÇÃO DE CADA VÍSCERA.....	77
FIGURA 9 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA METODOLOGIA DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Escherichia coli</i> .....	78
FIGURA 10 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA METODOLOGIA DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE <i>Enterococcus faecalis</i> .....	79



## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE ALBUMINA.....	75
GRÁFICO 2 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE TNF $\alpha$ .....	84
GRÁFICO 3 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÕES OBTIDOS NAS DOSAGENS DE TBAR (NMOL/MG DE PROTEÍNA) EM CADA SUB-GRUPO DO ESTUDO.....	86
GRÁFICO 4 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÕES OBTIDOS NAS DOSAGENS DE ENDOTOXINAS EM CADA SUB-GRUPO DO ESTUDO.....	88
GRÁFICO 5 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS INCIDÊNCIAS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA NOS SUB-GRUPOS .....	91
GRÁFICO 6 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÕES OBTIDOS NAS DOSAGENS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM CADA SUB-GRUPO DO ESTUDO.....	94

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	DILUIÇÕES DA ENDOTOXINA PADRÃO .....	81
TABELA 2 -	PREPARAÇÃO DAS DILUIÇÕES DO PADRÃO DE TNF $\alpha$ PARA CALIBRAÇÃO DO MÉTODO .....	84
TABELA 3 -	DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÕES DAS DOSAGENS DE TBARS (NMOL/MG DE PROTEÍNA) EM AMOSTRAS DE INTESTINO DE RATOS .....	86
TABELA - 4	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA PELO MÉTODO DE ANOVA NAS MÉDIAS DAS DOSAGENS DE TBARS, EM AMOSTRAS DE INTESTINO DE RATOS, NOS SUB- GRUPOS DO ESTUDO .....	87
TABELA - 5	DEMONSTRATIVO DOS RESULTADOS OBTIDOS NAS DOSAGENS DE ENDOTOXINAS .....	88
TABELA - 6	DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÕES DAS DOSAGENS DE DOSAGENS DE ENDOTOXINAS .....	86
TABELA - 7	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA PELO MÉTODO DE ANOVA NAS DOSAGENS DE ENDOTOXINA EM AMOSTRAS DE SANGUE DE RATOS NOS SUB-GRUPOS DO ESTUDO ....	89
TABELA - 8	DEMONSTRATIVO DA VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS EM TRIPLICATAS NAS PESQUISAS DE BACTÉRIAS INDICADORAS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA INDICADA PELO NÚMERO DE ISOLAMENTOS OBTIDOS EM CADA TESTE .....	90
TABELA - 9	TAXA DE OCORRÊNCIA DE ISOLAMENTOS DE <i>Escherichia coli</i> E <i>Enterococcus faecalis</i> EM ÓRGÃOS DE RATOS CONFORME OS GRUPOS DE ESTUDO .....	93
TABELA - 10	INCIDÊNCIA DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA NOS ÓRGÃOS ESTUDADOS CONFORME SUB-GRUPOS DO ESTUDO .....	91
TABELA - 11	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA PELO MÉTODO DE ANOVA NAS SOMATÓRIAS DAS TAXAS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA DAS AMOSTRAS DE ÓRGÃOS DE RATOS NOS SUB-GRUPOS DO ESTUDO .....	92
TABELA - 12	DEMONSTRATIVO DA VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS EM TRIPLICATAS NAS DOSAGENS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM AMOSTRAS DO GRUPO CONTROLE .....	92

TABELA - 13	DEMONSTRATIVO DA VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS EM TRIPLICATAS NAS DOSAGENS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM AMOSTRAS DO GRUPO ALOPURINOL .....	93
TABELA - 14	DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÕES DAS DOSAGENS DE TNF ALFA NOS SUB-GRUPOS .....	93
TABELA - 15	DEMONSTRATIVO DAS COMPARAÇÕES ENTRE AS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÕES DAS DOSAGENS DE TNF ALFA NOS SUB-GRUPOS .....	93
TABELA - 16	RESULTADOS OBTIDOS EM TRIPLICATAS NAS DOSAGENS DE TBARS EM AMOSTRAS DE INTESTINO DE RATOS .....	132
TABELA - 17	RESULTADOS OBTIDOS NAS DOSAGENS DE ENDOTOXINAS .....	139
TABELA - 18	RESULTADOS OBTIDOS EM TRIPLICATAS NAS DOSAGENS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM AMOSTRAS DO GRUPO CONTROLE .....	142
TABELA - 19	RESULTADOS OBTIDOS EM TRIPLICATAS NAS DOSAGENS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM AMOSTRAS DO GRUPO ALOPURINOL .....	146
TABELA - 20	RESULTADOS OBTIDOS EM TRIPLICATAS NAS PESQUISAS DE BACTÉRIAS INDICADORAS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA INDICADA PELO NÚMERO DE ISOLAMENTOS OBTIDOS EM CADA TESTE	154

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – DEMONSTRATIVO DA ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DO ESTUDO...65

## LISTA DE ABREVIATURAS

A -	Grupo alopurinol
ADP -	Difosfato de adenosina
AMP -	Monofosfato de adenosina
ATP -	Trifosfato de adenosina
C -	Grupo controle
EAO -	Espécies ativas de oxigênio
EDTA -	Ácido etileno diamino tetra acético
IF -	Interferon
IL -	Interleucina
LAL -	Lisado amebóide de <i>Limulus sp</i>
LNM -	Linfonodos mesentéricos
LPS -	Lipopolissacarídeo – endotoxina
MDO -	Malondialdeído
NAD -	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NDAH -	Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida
NF- $\kappa$ B -	Fator nuclear de transcrição NF- $\kappa$ B
nmol/mg -	Nano mol por miligrama
NO -	Óxido nítrico
PAF -	Fator agregador de plaquetas
PAM -	Pressão arterial média
PMN -	Polimorfonuclear
pg/ml -	Picograma por mililitro
Rpm -	Rotações por minuto
SOD -	Superóxido dismutase
SRTBA -	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
SSI -	Solução salina isotônica
TB -	Translocação bacteriana
TBARS -	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TNF $\alpha$ -	Fator de necrose tumoral alfa
UE/ml -	Unidade endotóxicas por mililitro



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1 OBJETIVOS.....	19
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	20
2.1 FISIOPATOLOGIA DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO .....	20
2.2 ISQUEMIA E HIPOXIA.....	21
2.3 REPERFUSÃO .....	23
2.4 FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO .....	26
2.4.1 Radical hidroxila .....	30
2.4.2 Óxido nítrico (NO) .....	31
2.4.3 Superóxido (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) .....	31
2.4.4 Peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	31
2.4.5 Toxicidade dos radicais .....	32
2.4.6 Mecanismos antioxidantes .....	33
2.4.7 Estresse oxidativo .....	35
2.4.8 Métodos de avaliação da peroxidação lipídica .....	36
2.5 ALOPURINOL.....	37
2.6 ENDOTOXINA BACTERIANA.....	42
2.7 SEPSE, FALÊNCIA DE MÚLTIPLOS ÓRGÃOS E TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA .....	54
2.8 A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA.....	56
2.9 FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF $\alpha$ ).....	59
<b>3 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	65
3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL .....	65
3.2 AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO .....	66
3.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS .....	66
3.3.1 Anestesia e preparação pré-cirúrgica.....	66
3.3.2 Procedimentos cirúrgicos no grupo controle.....	65
3.3.3 Procedimentos cirúrgicos no grupo alopurinol.....	68
3.4. COLETA DE AMOSTRAS .....	70
3.4.1 Coleta de sangue (Figura 5).....	70
3.4.2 Coleta de vísceras.....	71
3.4.2.1 Coleta de amostras para avaliação da translocação bacteriana (Figura 6)...71	
3.5 AFERIÇÕES.....	73
3.5.1 Dosagem de substâncias redutoras do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	73
3.5.2 Dosagem de proteínas .....	74
3.5.3 Dosagem de TBARS .....	75
3.6 AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA .....	76
3.6.1 Validação dos resultados.....	74
3.6.2 Hemoculturas .....	77
3.6.3 Preparação das amostras (Figura 8).....	77
3.6.4 Pesquisa de <i>Escherichia coli</i> (Figura 9) .....	78
3.6.5 Pesquisa de <i>Enterococcus faecalis</i> (Figura 10) .....	79
3.7 DOSAGEM DE ENDOTOXINAS EM AMOSTRAS DE PLASMA .....	80
3.7.1 Materiais.....	78
3.7.2 Procedimentos .....	80

3.7.2.1	Preparação de materiais despirogenizados.....	80
3.7.2.2	Preparação do reagente LAL.....	80
3.7.2.3	Preparação da endotoxina padrão.....	81
3.7.2.4	Análise qualitativa de endotoxina nas amostras de plasma de ratos.....	82
3.7.2.5	Análise quantitativa de endotoxina nas amostras de plasma de ratos.....	82
3.8	DOSAGEM IMUNOENZIMÁTICA DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF $\alpha$ ).....	82
3.8.1	Validação dos resultados.....	83
3.8.2	Materiais.....	83
3.8.3	Procedimentos.....	83
3.9	AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS.....	85
3.9.1	Comparações entre os grupos.....	85
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>86</b>
4.1	DOSAGENS DE SUBSTÂNCIAS REDUTORAS DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS).....	86
4.1.2	Comparações entre as médias e desvios padrões das dosagens de TBARS (Mmoles/mg de proteínas) nos sub-grupos.....	87
4.2	DOSAGENS DE ENDOTOXINAS.....	87
4.2.1	Validação das dosagens de endotoxinas.....	87
4.2.2	Comparação entre as médias dos sub-grupos.....	88
4.3	AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA.....	89
4.3.1	Validação dos resultados na pesquisa de bactérias indicadoras de translocação.....	89
4.3.2	Ocorrência de isolamento de <i>E. coli</i> e <i>E. faecalis</i> .....	90
4.3.3	Incidência de translocação bacteriana (TB) nos órgãos estudados.....	91
	Órgãos.....	91
4.3.4	Comparações das somatórias das translocações bacterianas (TB) dos órgãos estudados.....	92
4.4	DOSAGENS DE FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA.....	92
4.4.1	Validação dos resultados.....	92
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>111</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>112</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>129</b>
	ANEXO 1 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA EXPERIMENTAL.....	130
	ANEXO 2 – RESULTADOS OBTIDOS EM TRIPLICATAS NAS DOSAGENS DE TBARS EM AMOSTRAS DE INTESTINO DE RATOS.....	132
	ANEXO 3 - RELATÓRIOS ESTATÍSTICOS DAS VALIDAÇÕES PROCEDIDAS ENTRE OS RESULTADOS DAS DOSAGENS DE TBARS EM TRIPLICATAS.....	133
	ANEXO 4 - RESULTADOS OBTIDOS NAS DOSAGENS DE ENDOTOXINAS.....	139
	ANEXO 5 - RELATÓRIOS ESTATÍSTICOS DAS COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINA ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ALOPURINOL.....	140
	ANEXO 6 - RESULTADOS OBTIDOS EM TRIPLICATAS NAS DOSAGENS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM AMOSTRAS DO GRUPO CONTROLE.....	142

ANEXO 7 - RELATÓRIOS ESTATÍSTICOS DAS VALIDAÇÕES PROCEDIDAS ENTRE OS RESULTADOS DAS DOSAGENS DE TNF $\alpha$ EM TRIPLICATAS DO GRUPO CONTROLE.....	143
ANEXO 8 - RELATÓRIOS ESTATÍSTICOS DAS VALIDAÇÕES PROCEDIDAS ENTRE OS RESULTADOS DAS DOSAGENS DE TNF $\alpha$ EM TRIPLICATAS DO GRUPO ALOPURINOL .....	146
ANEXO 9 - RELATÓRIOS ESTATÍSTICOS DAS COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE TODAS AS DOSAGENS DE TBARS ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ALOPURINOL .....	150
ANEXO 10 - RELATÓRIOS ESTATÍSTICOS DAS COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE TODAS AS DOSAGENS DE TNF $\alpha$ ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ALOPURINOL .....	152
ANEXO 11 - RESULTADOS OBTIDOS EM TRIPLICATAS NAS PESQUISAS DE BACTÉRIAS INDICADORAS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA INDICADA PELO NÚMERO DE ISOLAMENTOS OBTIDOS EM CADA TESTE.....	154
Média.....	154
ANEXO 12 - RELATÓRIOS ESTATÍSTICOS DAS COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DAS AVALIAÇÕES DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ALOPURINOL.....	155



## 1 INTRODUÇÃO

A isquemia seguida de reperfusão é uma estratégia utilizada em cirurgias reconstrutivas vasculares para a contenção do sangramento, a qual pode contribuir em determinadas condições, para a ocorrência de complicações pós-operatórias. Apesar da restauração do fluxo sanguíneo ser essencial para prevenir dano celular irreversível induzido pela isquemia, a reperfusão *per se*, pode agravar o dano celular isquêmico e levar paradoxalmente a complicações sistêmicas como a síndrome da angústia respiratória do adulto, as disfunções renais e hepáticas e ocasionalmente, até ao cenário sombrio da síndrome de disfunção sistêmica de múltiplos órgãos.

Estas complicações em órgãos distantes àqueles que sofreram a isquemia e reperfusão ocorrem devido aos diferentes mediadores liberados na circulação sistêmica tais como células, citocinas pró-inflamatórias, adesinas e as espécies ativas de oxigênio (EAO).

Entre estes mediadores, destacam-se na literatura especializada os inúmeros estudos que buscam determinar o papel efetivo das EAO na gênese de doenças no homem, pois se sabe, que são indutoras da peroxidação dos lipídeos das membranas celulares, formando um subproduto tóxico, o malondialdeído (MDO). As interpretações sugeridas para orientar o conhecimento sobre o real mecanismo de indução da lesão causada pela lipoperoxidação e uma possível intermediação medicamentosa são problemas para os quais não se chegou ainda à solução final.

A utilização de medicamentos com a finalidade de reduzir os danos celulares secundários à isquemia seguida de reperfusão, tem estimulado tanto a pesquisa clínica como a experimental, através de propostas de mecanismos fisiopatológicos envolvidos. Nestas condições é reconhecida a importância da enzima xantina-oxidase na gênese destas EAO, que podem ter sua ação desviada para um substrato competidor. O alopurinol é um inibidor seletivo das etapas terminais da biossíntese de ácido úrico que é produzido principalmente pela oxidação da hipoxantina e da xantina, catalisada pela xantina-oxidase. A inibição dessa enzima é responsável pelos seus principais efeitos farmacológicos, por ser este medicamento um substrato inibidor competitivo desta enzima. Portanto, o alopurinol tem o potencial terapêutico para a redução dos danos celulares secundários à isquemia seguida de reperfusão e por consequência, as suas repercussões.

Este estudo ampara-se nos achados de Sthalke em 2001, que propôs um modelo de isquemia seguida de reperfusão de membros caudais em ratos, no qual foi observado a liberação de endotoxina (LPS) da luz intestinal para a corrente circulatória. Outros pesquisadores inferiram sobre a ação de EAO nas condições experimentais anteriormente citadas e de seus efeitos à distância em órgãos vitais e sobre a quebra da barreira intestinal, justificando teoricamente os achados de Sthalke, aos quais foi então sobreposta à hipótese de que também ocorresse translocação bacteriana.

### 1.1 OBJETIVOS

Estudar em ratos tratados e não tratados com alopurinol, os efeitos dos diferentes tempos (duas e três horas) de isquemia seguida de reperfusão, em membros caudais em relação à:

- Lipoperoxidação no intestino, pela formação de MDA;
- Quebra da barreira intestinal, indicada por liberação de LPS (endotoxemia) e translocação bacteriana intestinal para o sangue e outros órgãos abdominais;
- Indução de citocina pró-inflamatória ( $TNF\alpha$ ) em vigência de endotoxemia e translocação bacteriana.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 FISIOPATOLOGIA DA ISQUEMIA E REPERFUSÃO

O processo de isquemia e hipoxia se inicia com a oclusão de uma artéria ou enxerto. Quando este processo se desenvolve lenta e progressivamente, começando por uma estenose hemodinamicamente significativa, até chegar a uma oclusão total, há tempo e possibilidade de desenvolvimento de circulação colateral que pode eventualmente compensar, pelo menos em parte, a isquemia do tecido acometido. Esta é a situação que costuma ocorrer, por exemplo, com a oclusão trombótica arterial. Por outro lado, quando a oclusão arterial se faz de forma abrupta, como acontece, por exemplo, na embolia arterial, a hipoxia tecidual em geral é mais grave, culminando com alterações teciduais importantes e intensas repercussões clínicas, caso não seja restabelecido o fluxo sanguíneo ao tecido acometido (MAFFEI *et al.*..., 2002).

Embora o músculo esquelético tenha taxa de metabolismo relativamente baixa, quando comparado com outros tecidos (cérebro, miocárdio e rim), ele é o maior componente da extremidade inferior, atingindo mais de 90% da atividade metabólica (RUDERMAN *et al.* 1977; RULEIN e SMITH, 1990).

A isquemia é um dos problemas mais frequentes e desafiadores com que os cirurgiões vasculares se defrontam e é, ao mesmo tempo, paradoxal, pois, ao restabelecer o fluxo sanguíneo para um tecido ou órgão, podem ser desencadeadas lesões e alterações sistêmicas e/ou locais ainda mais intensas e graves que a isquemia *per se*.

Relata-se, na experiência clínica, o sucesso da revascularização de extremidades após 6 a 8 horas de oclusão arterial aguda (BLAISDELL; STEELE, ALLEN, 1978). Os distúrbios metabólicos durante isquemia ou hipóxia tissular são muito bem estabelecidos, porém evidências clínicas experimentais demonstram que os principais eventos que levam a disfunções celular e tecidual relacionam-se com a subsequente reperfusão (EVORA, 2000).



## 2.2 ISQUEMIA E HIPOXIA

A hipoperfusão sanguínea de um tecido ou extremidade, deixada sem tratamento, inevitavelmente acarreta necrose tecidual. Quando o fluxo sanguíneo tissular é interrompido uma série de processos metabólicos e enzimáticos são afetados. As reservas de ATP são rapidamente depletadas, há um acúmulo de lactato, a célula torna-se acidótica e são ativadas protases intracelulares (HACKEL e JENNINGS, 1988).

A respiração, aeróbica celular, denominada fosforilação oxidativa, é o primeiro ponto de ataque da isquemia e hipoxia. A equação da respiração normal pode ser resumida da seguinte forma:  $C_6 H_{12} O_6 \rightarrow 6 C_6O_2 + 12 H_2O + 674 \text{ Kcal} = 38 \text{ ATP}$ .

Quando a tensão de oxigênio dentro das células diminui, ocorre interrupção de fosforilação oxidativa e, conseqüentemente, cessa a geração de ATP. Para manter sua atividade, a célula passa a fazer glicólise anaeróbica, gerando três moléculas de ATP por unidade glicosil de glicogênio (revertida em lactato), o qual é rapidamente depletado (REIMER; JENNINGS e TATTUM, 1983). O ATP pode ser gerado, também, anaerobicamente, a partir do fosfato de creatinina, pela ação da enzima creatininaquinase. O declínio nos níveis de ATP acelera após três horas de isquemia, com virtual exaustão das reservas de fosfocreatina (HARRIS, *et al.*, 1980). Em consequência da glicólise e hidrólise de fosfatos, ocorre acúmulo de ácido láctico e de fosfatos inorgânicos, diminuindo o pH intracelular, o que acaba interferindo no funcionamento celular (COTRANS; KUMAR; ROBBINS, 1994).

Com as reservas e fontes energéticas depletadas, a bomba de  $Na^+$ , dependente de energia, começa a falhar e, em consequência, ocorre acúmulo de  $Na^+$  intracelular e difusão de  $K^+$  para fora da célula. O delicado equilíbrio celular, com maior pressão coloidosmótica intracelular em relação ao meio extracelular, não pode mais ser compensado pela bomba de  $Na^+$  e água e diminuição de  $K^+$ . Até este ponto, as lesões ainda são reversíveis com a reperusão (PICCINATO, 1991).

Persistindo a isquemia, o trombo arterial tende a se propagar, ocluindo as saídas e entradas da rede colateral. Além disso, o edema tecidual acaba comprimindo os vasos dentro dos tecidos e as próprias células dos vasos edemaciam, estreitando a luz vascular de arteríolas, capilares e vênulas (OURIEL, 2000). A partir desse estágio, as células passam a exibir alterações irreversíveis.

Ocorrem vacuolização das mitocôndrias, alterações nas membranas plasmáticas e engurgitamento dos lisossomos (MORENO,1991). A ruptura dos mesmos libera várias enzimas, como RNAses, DNAses, proteases, fosfatases, glicosidases e catepsinas (COTRANS, KUMAR e ROBBINS, 1994). A ativação das mesmas acaba digerindo os componentes celulares, degradando-os progressivamente e causando morte celular irreversível.

A tolerância dos tecidos e órgãos à isquemia é variável e multifatorial, e depende da duração do tempo de isquemia, das necessidades metabólicas das células de cada tecido, do aporte de circulação colateral e de fatores humorais locais (PERRY,1988). Por exemplo, nervos periféricos e tecido muscular são mais exigentes do ponto de vista metabólico e, portanto, costumam ser menos resistentes à isquemia que a pele.

Alterações irreversíveis em músculos esqueléticos ocorrem geralmente após 4-6 horas de isquemia completa, mas alterações metabólicas nesses tecidos podem persistir por mais de 16 horas, mesmo com oclusões arteriais temporárias incompletas. Portanto, não se pode determinar com precisão, para cada tipo de tecido, um período de isquemia seguro, além do qual a sua vitalidade ficaria irreversivelmente comprometida (PERRY,1991).

A isquemia prolongada pode, além disso, dificultar a reperfusão, seja por empilhamento de células sanguíneas vermelhas em capilares estreitados por edema endotelial, seja pelo tampão (plugging) de neutrófilos (WELBOURN et al.,1991). Os leucócitos, outrossim, liberam enzimas proteolíticas, radicais livres e outros produtos tóxicos, piorando as condições locais. As enzimas proteolíticas das células brancas sanguíneas destroem o ácido hialurônico e rompem as membranas basais, aumentando a permeabilidade capilar e o edema intersticial. O aumento do fluido intersticial e do volume celular pode aumentar a resistência vascular e, em associação com o aumento da viscosidade sanguínea, concorre para o estabelecimento de uma barreira adicional à restauração da perfusão tecidual normal (YOSHIDA et al., 1998).

A reversibilidade deste processo relaciona-se diretamente com o tempo de isquemia, o objetivo terapêutico principal é restabelecer a reperfusão o mais rápido possível (STHAL et al., 1980).

## 2.3 REPERFUSÃO

Haimovici em 1970 chamou as alterações metabólicas de reperfusão de síndrome metabólica mionefropática. Hearse, Humphrey e Bullock, em 1978 chamaram de paradoxo do oxigênio o agravamento das lesões após reperfusão, e McCORD em 1985, propôs que o mecanismo responsável pelo agravamento seria a geração de radicais livres do oxigênio consequente à reintrodução de oxigênio molecular no tecido isquêmico.

A lesão de reperfusão relaciona-se, classicamente, a dois fenômenos: o paradoxo do oxigênio e o paradoxo do cálcio. A reoxigenação causa lesão do sarcolema, da membrana, desorganização mitocondrial e outras alterações tissulares, indicando que a reintrodução do oxigênio inicia um rápido e grave processo de lesão celular. Consideráveis informações tem sido acumuladas mostrando que este efeito paradoxal da reoxigenação se deva às ações de radicais livres de oxigênio (CASE, 1989).

Radical livre é todo átomo, grupo de átomos ou molécula num estado particular que contém um ou mais elétrons não-pareados em seu orbital. Cada orbital pode ter no máximo dois elétrons, os quais normalmente ficam pareados na sua órbita externa (SECCOMBE e SCHAFF, 1994).

Os radicais livres são extremamente reativos, pois estão sempre ávidos por capturar elétrons de qualquer outro átomo ou molécula, para estabilizar sua configuração. Ao reagir com um não-radical, outro radical é produzido, gerando uma reação em cadeia na produção de radicais livres que, em última análise, amplifica seu efeito destrutivo (SECCOME e SCHAFF, 1994).

Os radicais livres são lesivos através de uma variedade de mecanismos:

- (1) peroxidação dos ácidos graxos das membranas celulares;
- (2) oxidação de grupos sulfidril inativando uma variedade de enzima;
- (3) alterações do DNA inibindo a síntese de ATP e consumindo as reservas de dinucleotídeos adenínicos da nicotinamida;
- (4) direta inativação do NO comprometendo os relaxamentos vasculares dependentes do endotélio;
- (5) formação de peróxinitrito, um ânion instável e tóxico, reagindo com o NO;



- (6) ativação de citocinas como interleucina-1. Dentro da luz de vasos reperfundidos os ânions superóxidos estimulam a agregação plaquetária e iniciam a liberação de variados fatores vasoconstritores, incluindo o ADP, o PAF, a serotonina e o tromboxane A2 (SECCOMBE e SCHAFF, 1994).

As espécies reativas mais importantes são o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o radical hidroxila ( $OH\cdot$ ). Os mecanismos do paradoxo do cálcio não são bem conhecidos, mas após a reperfusão há um maciço influxo de cálcio para dentro da célula, provavelmente por alteração da permeabilidade de membrana (CASE, 1989).

O cálcio mitocondrial eleva-se na isquemia total ou parcial, de micôndrias de células musculares, com 3 horas de duração. Após 30 minutos de reperfusão os níveis de cálcio triplicam na isquemia parcial e quintuplicam na isquemia total (PICCINATO 1991). O aumento de cálcio mitocondrial, que se agrava após a reperfusão, deve refletir o aumento do cálcio citoplasmático. Sabe-se que a captação de  $Ca^{2+}$  na matriz mitocondrial se opera eletrofereticamente em resposta a um potencial negativo da membrana interna que é mantida pelo transporte de elétrons ou pela hidrólise do ATP (MELLA, 1977).

Os principais mecanismos de eliminação de cálcio da mitocôndria fazem-se pela troca iônica  $Na^+/Ca^{2+}$  e em parte  $Ca^{2+}/H^+$  mantido à custa de ATP (McCORMACK, 1990). A capacidade total da via de captação pela mitocôndria é 10 vezes maior que o mecanismo de eliminação do cálcio (GARLID et al., 1988).

Esta disparidade entre o mecanismo de captação e eliminação, permite a mitocôndria, em algumas condições, tamponar ou regular a concentração extra mitocondrial de cálcio. Assim a elevação do cálcio mitocondrial segue-se ao aumento do cálcio citoplasmático (McCORMACK, 1990).

A elevação do cálcio citosólico foi descrita em células isquêmicas de músculo cardíaco (KATZ; RENTER, 1979; NAYLER; POOLE-WILSON; WILLIAMS, 1979; SHEN; JENNINGS, 1972; STONE et al., 1980). Esta elevação foi descrita em células isquêmicas do fígado e rim (CHIEN et al., 1977; WILSON et al., 1983).

No músculo grácil de cães, submetidos a 4 horas e 30 minutos e 5 horas de isquemia total e 30 minutos de reperfusão, fora encontrado aumento do cálcio tissular total. Este aumento do cálcio refletiria a entrada de cálcio nas células musculares (SMITH et al. 1990).

Níveis elevados de cálcio intracelular podem desacoplar a fosforilação oxidativa, ativar proteases celulares e promover contração muscular (MALIS; BONVNTRE, 1988; OGILVIE; ARMSTRONG e BAIRD, 1988; WROGEMANN; JACOBSON e BLANCHAER, 1973). Em situação de isquemia, a elevação do cálcio provavelmente ativa uma protease que converte a xantina dehidrogenase em xantina oxidase (McCORD, 1985).

O oxigênio molecular, na fase de reperfusão, reage com a xantina oxidase produzindo ânion superóxido. Este ânion é um radical livre de oxigênio, potencialmente lesivo à célula (PARKS et al., 1982; PARKS e BULKLEY; GRANGER, 1988). Existem várias origens potenciais de radicais livres de oxigênio. Encontram-se na literatura evidências circunstanciais que sugerem que a xantina oxidase é a principal fonte destes radicais no músculo esquelético (STIRPE e DELLA CORTE, 1969). O músculo esquelético contém xantina oxidase que se localiza no sarcolema e na mitocôndria das pequenas fibras aeróbicas, e também no endotélio capilar (ROY e MCCORD, 1982). Há, porém, controvérsias sobre a real ação de radicais livres de oxigênio pelo possível aumento da xantina oxidase no músculo esquelético (ROY e MCCORD, 1985).

Fora demonstrado que os varredores de radicais livres podem diminuir o edema muscular na reperfusão após 4 horas de isquemia total, em patas posteriores de cães. Isto sugere que os radicais livres produzidos pela conversão da xantina dehidrogenase em xantina oxidase aumentam a permeabilidade vascular e as lesões no músculo esquelético (KORTHIUS *et al.*, 1988).

Porém LINDSAY *et al.* em 1990, não encontraram alterações nos níveis de xantina dehidrogenase e xantina oxidase após 4 horas de isquemia total no músculo esquelético de cães, mas há outros trabalhos que atribuem aos radicais livres o papel de mediadores da lesão de reperfusão (PERLER, 1990; PERLER, 1984), entretanto outros autores não aceitam esta teoria (FAUST et al., 1988; RICCI et al., 1989). Faust et al. em 1988 sugerem inclusive, que deve existir outro mecanismo, além dos radicais livres que participa na lesão de isquemia e reperfusão do músculo esquelético.

O endotélio é o tecido mais vulnerável á reperfusão e exibe disfunção mesmo antes da musculatura lisa ou expressa lesão muscular (MCAFEE et al., 1990). A disfunção endotelial pode ser causa do aumento do tônus vascular e vasoespasmo após e a isquemia e reperfusão. Sabe-se que o comprometimento da



liberação do EDRF/NO, em particular devido à agregação plaquetária, ocorre precoce e tardiamente após isquemia regional e reperfusão (PEARSON; SCHAFF e VANHOUTE 1990). O provável mediador desta atividade vascular exacerbada de vasoconstrição é o ânion superóxido produzido pelo endotélio (LIN,1991; PEARSON; SCHAFF e VANHOUTE,1990).

Mesmo artérias reperfundidas com endotélio exibem hipercontratilidade a plaquetas agregadas. Isto ocorre ao mesmo tempo em que a função da musculatura lisa vascular mantém-se inalterada (PEARSON; SCHAFF e VANHOUTE, 1990). O neutrófilo também tem sido implicado como mediador central da lesão tissular em, virtualmente, todo sistema orgânico susceptível à lesão de reperfusão (SECCOMBE e SCHAFF, 1994).

O neutrófilo participa de uma série de mecanismos capazes de causar grave destruição tissular, no entanto tem sido muito difícil demonstrar um papel causal direto para o neutrófilo na lesão de reperfusão. Embora um papel central dos neutrófilos na lesão de reperfusão seja questionado, é importante reconhecer a sua significativa contribuição para a patogênese deste processo (NICHOLS,1988).

A modificação da lesão de reperfusão relacionada com os neutrófilos é motivo de grandes controvérsias. Modelos experimentais com modelos de músculo esquelético sugerem que a depleção de neutrófilos reduz a severidade da lesão de reperfusão, porém não previnem (KORTHUIS et al.,1988).

## 2.4 FORMAÇÃO DE RADICAIS LIVRES NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO

A fonte primária de radicais livres do oxigênio nos tecidos isquêmicos parece ser a enzima xantina oxidase. Durante a isquemia, a falta de oxigênio induz o metabolismo anaeróbico, com elevação da concentração local de ácido láctico. Na situação de isquemia, a acidose e a hipoxia alteram a cinética enzimática normal, com depleção dos estoques de ATP, quebra da homeostase celular e perda do gradiente iônico através das membranas celulares.

A produção de ATP é interrompida durante a hipoxia, mas seu consumo continua. Consequentemente, os ATP do estoque celular são degradados em ADP e AMP e, posteriormente em adenosina, inosina e hipoxantina (GRACE,1994).

A perda de energia resultante da isquemia desarranja a função das bombas iônicas da membrana celular, aumentando a concentração de  $Ca^{++}$  no citosol. O

Ca<sup>++</sup> promove a ativação das proteases intracelulares reguladas pela calmodulina e estas transformam a xantina desidrogenase em xantina oxidase. Diferentemente da xantina desidrogenase, que não precisa de oxigênio para converter a hipoxantina em xantina, a xantina oxidase precisa de oxigênio molecular para realizar essa conversão. Conseqüentemente, durante a isquemia e hipoxia, como não há oxigênio, ocorre um acúmulo de hipoxantina e xantina oxidase nos tecidos (HALLIWEL e GUTHERIDGE, 1986).

Com a reperfusão, a hipoxantina acumulada é oxidada em xantina pela xantina oxidase, e a xantina é transformada em ácido úrico. Nessa reação de oxidação, diferentemente da xantina desidrogenase, que utiliza o NAD<sup>+</sup> como acceptor de elétrons, a xantina oxidase transfere elétrons para o oxigênio molecular (agora presente com a reperfusão), gerando o radical superóxido. Este é instável, transformando-se em peróxido de hidrogênio, espontaneamente ou pela ação da superóxido dismutase (SOD), e o peróxido de hidrogênio, por sua vez, é transformado em água pela ação da catalase e glutathione peroxidase. Como o substrato (hipoxantina) para a xantina oxidase ficou acumulado durante a isquemia, a produção de radical livre na reperfusão acaba sobrepujando a capacidade de neutralização dos antioxidantes endógenos e esses radicais passam a exercer livremente as suas ações deletérias. O radical superóxido promove a liberação de íon ferroso da ferritina, o qual reage com o peróxido de hidrogênio, formando o altamente tóxico radical hidroxila (HORNER, 1997).

Os radicais livres e, em particular, o radical hidroxila iniciam a peroxidação das membranas celulares, liberando ácido araquidônico e radicais livres lipídios peroxil. O ácido araquidônico é metabolizado pela cicloxigenase em tromboxano, prostaglandinas, PGE1 e PGE2, ou pela lipoxigenase, em leucotrienos LTB4, C4, D4 e E4. O radical peroxil promove lipoperoxidação adicional, retirando um hidrogênio do ácido graxo, dando origem a uma reação em cadeia, cujo produto final é o dialdeído malônico (MDA) e cuja dosagem é muito utilizada na investigação de isquemia e reperfusão. A perda da integridade da membrana, associada à lesão do DNA e de componentes celulares, culmina com citólise e necrose tecidual (MEERSON, 1982).

Os radicais livres podem, também atuar de forma indireta, atraindo e ativando neutrófilos nos tecidos envolvidos. Os neutrófilos ativados secretam enzimas proteolíticas (mieloperoxidases, elastases, proteases etc.), sintetizam

prostaglandinas, liberam radicais livres, além de, ocluírem a microcirculação na fase de reperfusão, dificultando o fluxo sanguíneo. Essa oclusão de microcirculação é chamada de fenômeno da não-reperfusão (no-reflow phenomenon) (PERRY,1991).

A mieloperoxidase liberada pelos neutrófilos catalisa a reação do peróxido de hidrogênio com o cloro, formando o hipoclorito, que é um potente agente oxidante. Este, por sua vez, é capaz de oxidar irreversivelmente adenina-nucleotídeos, citocromos e proteínas com ferro e enxofre em sua composição (HINDER e STEIN,1997). Portanto, o neutrófilo é um importante mediador na reoxigenação, e as lesões de isquemia e reperfusão dependem bastante da ação dos mesmos (SPARK et al.,1997).

Outro fator importante envolvido nas lesões de isquemia e reperfusão é o óxido nítrico (NO), que é um gás radical livre encontrado não só nas células endoteliais, como também em neurônios de L-arginina, oxigênio molecular e NADPH, pela enzima óxido nítrico sintetase. Essa enzima é ativada pelo influxo de  $Ca^{++}$  no interior da célula. Além de vasodilatação, o NO tem importante papel na inflamação e, por ser radical livre, é citotóxico para certos micróbios e células tumorais. Paralelamente, o NO reage com o radical superóxido, dando origem, via ânion peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), ao forte oxidante dióxido de nitrogênio e ao altamente reativo radical hidroxila (COTRANS; KUMAR e ROBBINS, 1994).

Radi et al. em 1991 demonstraram que o peroxinitrito e seus produtos de decomposição podem iniciar a peroxidação lipídica sem a necessidade de ferro. Existem evidências de que há uma estreita relação entre o NO e a endotelina, na isquemia e reperfusão. Na isquemia, a diminuição da força de cisalhamento (shear-stress), a lesão vascular e níveis reduzidos de NO poderiam estimular a liberação da endotelina, com consequentes vasoconstrição e piora da isquemia (LERMAN e BURNETT, 1992). Nos casos graves de isquemia podem ocorrer o rompimento celular e a rabdomiólise. Nesses casos, ocorre liberação de mioglobina e potássio na circulação (IHNKEN et al., 1996). Quando o fluxo sanguíneo é restaurado, essas substâncias, a acidose, a hiperpotassemia e/ou neutrófilos podem lesar diretamente o trato gastrointestinal (YASSIN,1997; YOSHIDA et al., 1998), os pulmões (síndrome de angústia respiratória aguda de adulto) e o coração com arritmias e baixo débito (PÓ,1995). Além disso, a mioglobina, a creatinina fosfoquinase (CPK), o lactato e as toxinas podem causar nefropatia, insuficiência renal e morte. A isquemia prolongada seguida de reperfusão, mediada pelos radicais



livres, pode precipitar um edema muscular acentuado, com compressão do leito venoso do membro dentro das fáscias musculares, dando origem à síndrome do compartimento (JENSEN e SANDERMANN, 1997). Se o compartimento não for rapidamente liberado cirurgicamente, podem ocorrer lesões neuromusculares irreversíveis e necrose muscular (PERRY, 1991).

A geração de espécies reativas de oxigênio faz parte do metabolismo normal em diversas circunstâncias, como por exemplo a geração oxidativa de energia pela cadeia respiratória na mitocôndria, a detoxicação de xenobióticos pelos citocromos, a morte de microorganismo pelos fagócitos, o metabolismo do ácido aracdônico para gerar prostaglandinas e leucotrienos e até a ovulação e fertilização. Apesar da presença nas células de diversos e potentes sistemas antioxidantes endógenos, é possível a produção local de oxidantes superar as defesas (ABDALLA, 1993). Tal fato acarreta lesão tecidual pelos seguintes mecanismos:

- 1) Peroxidação de lipídeos das células e das organelas celulares;
- 2) Desnaturação de proteínas estruturais e funcionais;
- 3) Agressão aos ácidos nucléicos;
- 4) Desnaturação de polissacarídeos do interstícios e da membrana basal.

Desta forma, a toxicidade local dos radicais livres e de outros metabólicos tóxicos do oxigênio constituem uma via comum de agressão tecidual de diversos processos patológicos, embora em outras circunstâncias possam representar apenas consequência da lesão (HALLIWEL, 1994).

A prevenção das lesões teciduais provocadas pelos radicais livres tem sido objeto de considerável números de estudos (HALLIWEL; GUTHERIDGE, 1989; HALLIWEL, 1992; HALLIWEL, 1994).

Radical livre é espécie (átomo ou molécula) capaz de existir independente (daí o termo “livre”) e que contenha um ou mais elétrons não pareados. Elétron não pareado é qualquer elétron que ocupe um orbital. A presença de um ou mais elétrons não pareados determina a atração para um campo magnético o que algumas vezes torna a substância altamente reativa. De modo geral essas espécies são instáveis, tem meia vida muito curta (de minutos à nano segundos) e reagem rapidamente com diversos compostos e alvos celulares. Radicais livres podem ser formados pela perda de um único elétron ou pelo ganho de um elétron de uma

substância não radical. Os radicais livres podem ser formados pela quebra de uma ligação covalente e um elétron de cada um dos pares permanece em cada átomo, este processo é denominado fissão homolítica(  $A..B \rightarrow A. + B.$  ). A energia necessária para dissociar a ligação covalente pode ser fornecida pelo calor, radiação eletromagnética ou outras fontes. O mais simples dos radicais livres é um átomo do elemento hidrogênio, com um próton e um único elétron (HALLIWEL, 1994).

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, mitocôndrias, retículos endoplasmático, membrana celular e núcleo de todas as células aeróbicas. Segundo De Bono em 1994, biologicamente, quatro importantes vias são responsáveis pela produção de espécies reativas do oxigênio:

- 1) reações enzimáticas de oxiredução;
- 2) auto oxidação;
- 3) atividade da peroxidase;
- 4) Reação de Fenton.

Os tipos de reação dos radicais livres incluem adição de radical, transferência de elétrons e separação de átomos. Isto resulta em alterações nas moléculas de proteínas, de glicoproteínas e das bases purínicas e pirimídicas, oxidação de tióis, peroxidação de lipídeos, formação de polímeros, epóxidos e endoperóxidos.

A natureza autocatalítica das reações dos radicais livres é o fator mais importante na deterioração oxidativa de substratos orgânicos. Durante o estágio de propagação um radical livre pode produzir *ad infinitum*, onde somente a concentração do oxigênio e do reagente estabelece os limites da reação (BONORDEN e PARIZA, 1994).

#### 2.4.1 Radical hidroxila

A reatividade química dos radicais livres é variável. Um dos mais reativos é o radical hidroxila. A exposição de organismo vivos à radiação ionizante causa a fissão da ligação O-H da água originando o radical hidroxila:  $H_2O \rightarrow H. + OH.$ , outra possibilidade de formação de radical hidroxila em sistema biológico é representada

pela interação entre metais de transição como o ferro e o cobre, radical superóxido e peróxido de hidrogênio (BONORDEM e PARIZA, 1994).

#### 2.4.2 Óxido nítrico (NO)

Enquanto o radical hidroxila é provavelmente sempre prejudicial, outros radicais menos reativos podem ser convenientes *in vivo*. Os radicais livres podem ser produzidos por vias metabólicas em organismos vivos. O óxido nítrico é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina pelas células endoteliais, por fagócitos e por algumas células cerebrais. O NO é um agente vasodilatador e possivelmente um importante neurotransmissor (MONCADA e HIGGIS, 1993).

#### 2.4.3 Superóxido ( $O_2^-$ )

O radical superóxido é produzido por células fagocitárias e as auxiliam na inativação de micro-organismos. O radical superóxido pode ser gerado por reações de auto oxidação ou por reações enzimáticas. A hemoglobina, a mioglobina e as catecolaminas são moléculas que se auto oxidam gerando  $O_2^-$ . Várias enzimas, tais como a xantina oxidase, NADPH oxidase e diversas flavina desidrogenases geram superóxidos (ABDALLA, 1993; HALLIWEL 1994).

#### 2.4.4 Peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ )

A maior parte do radical superóxido gerado *in vivo* provavelmente origina-se de uma reação não enzimática ou da dismutação catalisada pela superóxido dismutase ( $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ ); isto gera uma molécula não radical. O peróxido de hidrogênio tem alto poder de difusão dentro da célula; é produzido *in vivo* pela ação de diversas enzimas oxidases, tais como as aminoácido oxidases e a xantina oxidase (CHANCE; SIES e BOVERS, 1979; GRAGER, 1988).

A xantina-oxidase catalisa a oxidação da hipoxantina em xantina e desta em ácido úrico. o oxigênio é simultaneamente reduzido a  $O_2^-$  e  $H_2O_2$ . É possível verificar aumento de xantina oxidase quando o tecido é submetido a alguns tipos de agressões, tais como trauma ou hipóxia (GRAGER, 1988).



#### 2.4.5 Toxicidade dos radicais

As espécies primárias de radicais livres diferem marcadamente na sua reatividade e o seu potencial lesivo às células depende da sua reatividade química. Paralelamente à questão de sua formação no ambiente biológico, o radical hidroxila apresenta aspecto de grande importância representado pela ação iniciadora das lesões, desde que é capaz de reagir com a Maior das moléculas biológicas com proporção constante da ordem de  $10^{10}$  ou mais (HALLIWEL e GUTHERIDGE, 1989).

Este fato apresenta vantagens e desvantagens; as lesões causadas pelo OH são localmente circunscritas, embora possam determinar o aparecimento de radicais secundários produzidos durante a sua ação, os quais poderão se difundir no meio intracelular ou mesmo no espaço extracelular, sendo assim danosos em sítios distantes de seu local de origem. Os principais alvos de ataque dos radicais livres nas células são as proteínas, o ADN e os lipídeos.

Quanto às proteínas as modificações observadas causadas pelos radicais livres na estrutura da molécula proteica podem contribuir na gênese de processos patológicos de duas maneiras: pela modificação da estrutura de enzimas o que acarreta alteração na função enzimática ou pela modificação estrutural de proteínas que desempenham importante papel na arquitetura celular (STADMAN e OLIVER, 1991).

Quanto ao ADN os radicais livres são responsáveis por modificações nas bases nitrogenadas do ADN levando assim a mutagênese e carcinogênese. Os radicais livres podem interagir com as bases purínicas e pirimidínicas ou com a desoxirribose (SARAFIAN e BREDESSEN, 1994; HALLIWELL e ARUOMA, 1993).

Em relação aos lipídios a susceptibilidade dos ácidos graxos insaturados ao ataque de radicais livres tem sido objeto de vários estudos. Existem dois aspectos fundamentais de interesse neste processo, que envolvem a ação dos radicais livres e a etiologia das doenças. O primeiro é representado pela possibilidade da peroxidação de ácidos graxos insaturados nas membranas biológicas. O segundo aspecto diz respeito à possibilidade da oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados ocorrer nas lipoproteínas circulantes. Ambos os processos são de grande importância no entendimento da participação dos radicais livres na patogenia de doenças degenerativas (RICE-EVANS, 1994).

A iniciação da peroxidação geralmente ocorre pelo ataque de várias espécies reativas (R), tais como  $\text{NO}_2$ ,  $\text{OH}\cdot$  e  $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ , capazes de retirar um átomo de hidrogênio da cadeia lateral do ácido graxo poli-insaturado na membrana ou na lipoproteína, levando ao aparecimento de um elétron não pareado no carbono:  $-\text{CH} + \text{R}\cdot \rightarrow \text{C}\cdot + \text{RH}$ ; o radical carbono reage rapidamente com o oxigênio:  $-\text{C}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow -\text{CO}_2\cdot$ ; o radical peroxila resultante ataca a cadeia lateral do ácido graxo adjacente, gerando um novo radical carbono:  $-\text{CO}_2\cdot + -\text{CH} \rightarrow -\text{CO}_2\text{H} + -\text{C}\cdot$ . A reação em cadeia prossegue e os peróxidos de lipídios acumulam-se na membrana. Peróxidos lipídicos desestabilizam as membranas e as tornam permeáveis aos íons. Radicais peroxil podem atacar além dos lipídeos, as proteínas da membrana, alterando enzimas, receptores e sistemas de transdução, e além disso oxidar o colesterol (ABBEY, 1991; HALLIWEL e GUTHERIDGE, 1989; JIALAL, 1992).

#### 2.4.6 Mecanismos antioxidantes

Antioxidantes são substâncias capazes de inibir a oxidação. Os antioxidantes prolongam a fase de iniciação ou inibem a fase de propagação da auto oxidação, entretanto, não previnem completamente a oxidação (ABDALLA, 1993). Os antioxidantes podem ser agrupados em duas grandes categorias.

O sistema de defesa primário ou inibidor preventivo, engloba as substâncias que impedem a geração de espécies reativas, ou sequestram-nas de forma a impedir sua interação com alvos celulares, isto é, bloqueiam a etapa de iniciação da cadeia radicalar. Este grupo é representado pelas enzimas antioxidantes, quelantes e proteínas como a transferrina e a ceruloplasmina e substâncias não enzimáticas (BONORDEN e PARIZA, 1994). O sistema de defesa secundário é formado por compostos capazes de interromper a etapa de propagação da cadeia de auto oxidação, para isto reagem com os radicais livres produzindo compostos estáveis. Exemplos de antioxidantes secundários incluem o ascorbato,  $\beta$ -caroteno, urato, isômero dieno conjugados do ácido linoléico, fenóis, carbazóis, furfurais e furanos (DE BONO, 1994).

Preferentemente, os antioxidantes são regenerados por agentes redutores moderados como o ácido ascórbico e o atocopherol, antioxidantes respectivamente hidro e lipossolúvel em sistemas biológicos (BONORDEM e PARIZA, 1994).

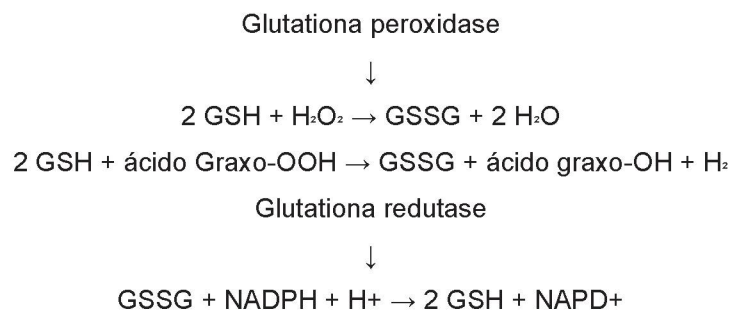


Os mecanismos antioxidantes de defesa, primários e auxiliares, extra e intracelulares, apresentam localização celular e funções específicas, são eles: o mecanismo enzimático, o sequestro de metais de transição, proteção por pequenas moléculas e os sistemas de reparo. Nos mecanismos enzimáticos temos a superóxido dismutase (SOD), a glutatona peroxidase, as catalases, citocromo c peroxidase.

As superóxido dismutases removem o radical superóxido acelerando sua conversão a peróxido de hidrogênio:  $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ . Células de mamíferos apresentam SOD contendo manganês (MnSOD) com seu sítio ativo na mitocôndria, enquanto o SOD com cobre e zinco (CuZnSOD) é abundantemente no citoplasma (FRIDOVICHI, 1986).

As catalases convertem o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio:  $2H_2O_2 \rightarrow 2 H_2O + O_2$ . A catalase está presente nos peroxissomas e serve provavelmente para destruir o peróxido de hidrogênio gerado pelas oxidases localizadas nestas organelas (CHANCE; SIES e BOVERS, 1979).

A glutatona peroxidase, uma selenioproteína, é a principal enzima responsável pela remoção do peróxido de hidrogênio gerado à custa da superóxido dismutase no citoplasma e mitocôndrias das células dos mamíferos; isto ocorre a partir da oxidação do tripeptídeo glutatona (ácido glutâmico-cisteína-glicina) da sua forma reduzida (GSH) para a sua forma oxidada (GSSG). A glutatona redutase, uma flavoproteína, regenera o GSH a partir da GSSG, com NADPH como fonte redutora (CHANCE; SIES e BOVERS, 1979).



O sequestro de metais de transição um importante mecanismo adicional de defesa é representado pelas proteínas de transporte e armazenamento. Desde que íons de ferro e cobre são poderosos promotores de lesão por radicais livres, acelerando a lipoperoxidação e causando a formação de radicais hidroxila, um

complexo sistema de proteínas asseguram que estes íons estejam livres. A ferretina é a forma habitual de armazenamento de ferro enquanto a transferrina é a proteína de transporte. O ferro ligado à essas proteínas não estimula reações de radicais livres (HALLIWEL e GUTHERIDGE, 1989).

Quanto a proteção de pequenas moléculas elas podem exercer seu efeito antioxidante, que agindo diretamente na neutralização dos radicais livres quer participando de sistemas enzimáticos com esta função. São elas vitaminas C, E, carotenos, glutathiona e ácido úrico (CHANCE; SIES e BOVERS, 1979; HALLIWEL, 1994).

Por fim, os sistemas de reparo agem destruindo as proteínas lesadas pelos radicais livres, uma vez que os mecanismo antioxidantes não são completamente efetivos, são exemplos de sistemas de reparo as enzimas proteases e fosfolipases (STADMAN e OLIVER, 1991).

#### 2.4.7 Estresse oxidativo

A formação de radicais livres e as defesas antioxidantes encontram-se em aproximado estado de equilíbrio, portanto, é fácil entender que a quebra desta condição em favor dos radicais livres crie uma situação de desequilíbrio que é denominado de estresse oxidativo (SIES, 1991).

Assim sendo o estresse oxidativo pode acontecer de duas maneiras; pela depleção de antioxidantes por má nutrição ou por produção excessiva de radicais livres, por exemplo, quando da exposição a elevada concentração de  $O_2$  (GRISHAN, 1993; HALLIWEL; GUTHERIDGE, 1989; HALLIWEL, 1992).

As células são capazes de tolerar o estresse oxidativo de média intensidade, para tal respondem com aumento da síntese nos sistemas de defesa antioxidante de modo a restaurar o estado de equilíbrio. Entretanto, o estresse oxidativo grave pode produzir alterações interdependentes do metabolismo celular, de grande importância, que pode culminar com morte celular (COCHRANE, 1991; HALLIWEL e GUTHERIDGE, 1989; HALLIWEL e GUTHERIDGE, 1987).

Uma vez que o estresse oxidativo ocorre em algum grau após lesão tecidual, a principal questão a ser respondida na avaliação da participação dos radicais livres nas diferentes doenças não é se podemos demonstrar o estresse oxidativo mas sim se o estresse oxidativo desempenha papel de importância na

atividade da doença. Existem evidências de que em algumas circunstâncias os radicais livres seriam a causa da doença. Entretanto, na maioria das vezes o estresse oxidativo é um fenômeno secundário, ou seja, uma consequência da atividade da doença, podendo as espécies oxidantes estar envolvidas na fisiopatologia dessas doenças, ou representarem um epifenômeno (ABDALLA,1993; HALLIWEL,1994).

O fato de o estresse oxidativo ser um fenômeno secundário em determinadas condições não minimiza sua participação na atividade do processo patológico, de modo que sua importância irá variar em diferentes doenças (HALLIWEL,1992).

#### 2.4.8 Métodos de avaliação da peroxidação lipídica

Diversas técnicas são utilizadas para medir a peroxidação de lipídeos ou de ácidos graxos como a reação com o ácido tiobarbitúrico, glutational, determinação da perda de ácidos graxos, dienos conjugados, ensaio idiométrico, análise fluorescente de produtos da peroxidação lipídica e outros. As técnicas quantificam diferentes produtos formados em momentos distintos da peroxidação lipídica, como por exemplo dienos conjugados e dialdeído malônico: a sensibilidade e especificidade da técnica depende do tipo do produto a ser quantificado (HALLIWEL e GUTHERIDGE, 1989; SLATER,1984).

O teste com ácido tiobarbitúrico ("TBA") foi introduzido por Kohn e Liversedge em 1944 e ainda é um dos métodos mais utilizados para medida da peroxidação lipídica (CHIRICO,1994). A técnica tem por objetivo quantificar o dialdeído malônico ("MDA") formado na peroxidação lipídica. O "MDA" é capaz de reagir, sob aquecimento em meio ácido, com o ácido tiobarbitúrico ("TBA") originando um composto de cor de rosa; este composto quando extraído da solução por um solvente orgânico (n-butanol) terá sua concentração determinada e expressa como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRTBA). Esta técnica é de fácil execução, baixo custo e pode ser empregada para determinação das SRTBA em diferentes materiais biológicos, especialmente em tecidos (UCHIAYAMA e MIHARA, 1978).

Quando a determinação é feita em fluidos orgânicos pode ocorrer a presença de interferentes, como pigmentos biliares e glicoproteínas, com



consequente formação de cromógenos que não as SRTBA, fornecendo assim resultados falso positivo. A fim de evitar tais interferentes, a quantificação das SRTBA em fluídos orgânicos deve ser feita pela cromatografia líquida de alta eficiência (CHIRICO,1994).

## 2.5 ALOPURINOL

O alopurinol e seu metabólito principal, aloxantina, são inibidores competitivos e não competitivos, respectivamente, da enzima xantina-oxidase, sendo esta inibição seu principal efeito farmacológico. A aloxantina possui uma permanência longa nos tecidos e é, indubitavelmente, responsável pela maior parte da atividade farmacológica da droga (RHODERN,1998; ZAGER e GMUR, 1989).

A principal ação proposta para os efeitos benéficos do alopurinol seria que inibindo a enzima xantina-oxidase, que catalisa de modo irreversível a transformação de hipoxantina, proveniente do catabolismo de compostos energéticos de purina tais como o ATP, ADP, AMP, em xantina. Portanto, interrompendo essa rota de degradação, permitir-se-ia a ressíntese do ATP durante a fase de reperfusão, restabelecendo assim, pelo menos em parte, o nível energético para a manutenção dos eventos metabólicos que se processam em nível celular (CUNNINGHAM e HEAVY, 1974; PALLER; HOIDAL e FERRIS,1984; DI LISA,1995).

Entretanto os efeitos mais pronunciados residiram, principalmente, na sua capacidade de inibir a geração de espécies ativas do oxigênio, no período reperfusional, tendo ser tendo em vista ser a enzima xantina-oxidase aceptora de elétrons e, portanto, capaz de formar o radical superóxido, hidroxil e peróxido de hidrogênio (ZAGER e GMUR, 1989; GREENE,1992; CHEUNG, et al., 1983).

Granger em 1988 relatou que os radicais livres de oxigênio estão intimamente envolvidos na lesão celular de isquemia e reperfusão. Eles são gerados por dois sistemas enzimáticos: exógeno (neutrófilos ativados) e endógeno (na célula submetida à isquemia). Durante o período isquêmico a ATP (adenosina trifosfato) é catabolizada para hipoxantina; durante a reperfusão, o oxigênio molecular é reintroduzido no tecido onde reage com a hipoxantina e xantina-oxidase para produzir o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio. Na presença do ferro, o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio reagem para a formação do radical hidroxil; o qual é altamente citotóxico e reativo iniciando a peroxidação lipídica dos

componentes da membrana celular com subsequente liberação de substâncias que atraem, ativam e promovem a aderência dos granulócitos ao endotélio microvascular. Os granulócitos aderidos causam lesão celular endotelial adicional por produção de radicais livres, superóxido e várias proteases.

Perry e Fantini em 1987, Beyersdorff et al. em 1989 e Quinhonhez-Baldreh et al. em 1991 chamaram a atenção, em seus estudos experimentais na área de isquemia e reperfusão da musculatura esquelética, para a existência de recursos na tentativa de evitar a lesão muscular e a de órgãos à distância após o restabelecimento do fluxo sanguíneo para a extremidade isquêmica através de:

- 1 - removedores de radicais livres derivados do oxigênio;
- 2 - análogos da prostaglandina;
- 3 - inibidores de leucócitos;
- 4 - reperfusão controlada;
- 5 - a combinação destes fatores.

Granger, Hollawarth e Parks (1986) relataram em trabalhos experimentais a ação do alopurinol através de seu mecanismo inibidor competitivo da xantina-oxidase na lesão pós reperfusão desde então o alopurinol tem sido usado nos rins, intestinos e miocárdio, mas seus efeitos no músculo esquelético na reperfusão ainda não estão totalmente elucidados.

Punch et al., em 1992 desenvolveram um estudo sobre o papel da xantina-oxidase no fenômeno do não refluxo, este estudo foi desenhado para provar a hipótese de que os radicais livres derivados do oxigênio estão envolvidos na iniciação do fenômeno do não refluxo. Foi desenvolvido um modelo reproduzível de não refluxo em membros caudais de ratos. Estudos com Doppler a laser confirmaram que os membros caudais foram bem reperfundidos após 2 e 4 horas de isquemia, mas que a reperfusão cessou em dez minutos após 6 horas de isquemia. Amostras de sangue e biopsia de pele e músculo foram feitas após 2 e 4 horas de isquemia para estudar os danos aos tecidos. Nas amostras de sangue foram avaliados xantina-oxidase, xantina-desidrogenase e creatinofosfatoquinas, foram também quantificado o extravasamento de albumina nas amostras dos tecidos.

Grupos de animais foram tratados com inibidores da xantina-oxidase (alopurinol), enzimas antioxidantes (superóxido-dismutase, catalase) e scavenger de



radicais livres (dimetil sulfóxido e dimetil thiouréia) para avaliar o papel dos radicais livres no dano da isquemia e reperfusão em membros caudais de ratos.

Os resultados encontrados foram que após 4 horas de isquemia seguida de reperfusão os níveis de xantina-oxidase foram 3 vezes maior que os níveis pré-isquemia ( $p < 0,05$ ) e os níveis de xantina-desidrogenase não se alteraram. O pré-tratamento com inibidor da xantina-oxidase reduziu a atividade da xantina-oxidase para níveis desprezíveis e atenuou o extravasamento de albumina. Então no trabalho foi observado que em animais pré-tratados com alopurinol ou superóxido-dismutase, a reperfusão persiste após 6 horas de isquemia. Estes dados sugerem que na isquemia seguida de reperfusão, o dano ao tecido está relacionado aos produtos derivados do oxigênio através da atividade da xantina-oxidase.

Oredsson, Plate e Qvarfordt em 1991 realizaram um trabalho intitulado Alopurinol - um varredor de radicais livres – reduz o dano da reperfusão em músculos esqueléticos. Reperfusão do músculo esquelético pode levar ao aumento de permeabilidade vascular, edema e pro fim necrose do músculo. Os radicais livres derivados do oxigênio tem sido sugeridos como fator etiológico nos danos após a reperfusão. Coelhos foram submetidos à 4 horas de isquemia seguido de 2 horas de reperfusão com solução tampão de Krebs. Um membro de cada animal foi reperfundido com oxigênio saturado e solução tampão (membro reoxigenado), enquanto o outro membro fora reperfundido com nitrogênio saturado e solução tampão (membro não reoxigenado). Seis animais receberam alopurinol oralmente dois dias antes do experimento e 10 animais não foram tratados com alopurinol. Os resultados foram expressos na comparação entre os membros reoxigenados e não reoxigenado. Sem o tratamento com alopurinol o aumento da quantidade de água e o peso nos membros reoxigenados excederam aos não reoxigenados com  $p < 0,05$ , com alopurinol houve redução significativa do aumento da quantidade de água e do peso nos membros. Sendo assim estes resultados demonstraram que um dano adicional à isquemia do músculo esquelético ocorre durante a reperfusão com oxigênio e que o alopurinol pode minimizá-lo.

Concannon, Dooley e Puckett em 1991 em seu trabalho sobre a melhoria na sobrevivência em um modelo de reimplantação com músculo isquêmico; analisaram a eficácia da superóxido-dismutase e alopurinol na prevenção dos danos da reperfusão em ratos utilizando um modelo de reimplantação de membros após 6 horas de isquemia quente. Imediatamente antes da reperfusão dos membros

reimplantados os animais recebiam uma dose intravenosa de superóxido-dismutase e de alopurinol, ou uma solução controle. Nos ratos que receberam a solução controle 30% dos membros ficaram viáveis; no grupo da dismutase e do alopurinol 75% dos membros ficaram viáveis, nos grupos que receberam somente superóxido-dismutase ou somente alopurinol, 58% e 60% dos membros respectivamente ficaram viáveis. Então este estudo sugere que a administração de superóxido-dismutase e alopurinol pode ajudar a prevenir o dano causado pela isquemia-reperfusão do músculo esquelético em isquemia aguda e poderá melhorar o salvamento de membros depois de isquemia prolongada.

Saez et al. em 1986 sugerem que os radicais livres de oxigênio estão implicados na patogênese das lesões por isquemia. E realizou um estudo para avaliar os efeitos do alopurinol, um inibidor da xantina-oxidase, na geração de malondialdeído, níveis de sulfidril livre, consumo de oxigênio e quantidade de água nos músculos gastrocnêmio de ratos submetidos à choque por torniquete e depois com os membros caudais reperfundidos. A desidrogenase láctica serica fora dosada após a ligadura dos vasos.

Os resultados mostraram que quatro parâmetros dos músculos não foram alterados durante 5 horas de isquemia, mas que nos membros reperfundidos houve produção de malondialdeído, aumento dos níveis de sulfidril, consumo de oxigênio e da quantidade de água foram significativamente alterados no grupo controle, mas não no grupo pré-tratado com alopurinol. A desidrogenase láctica mostrou-se presente em todas as amostras dos animais não tratados, mas foram menos evidentes nos animais pré-tratados com alopurinol.

Então este trabalho sugere que após a isquemia nos músculos afetados é impossível de restabelecer a função normal quando ele for reperfundido. O dano subsequente à reperfusão é provavelmente devido a geração de radicais superóxidos citotóxicos, formados durante a transformação, catalizada pela xantina-oxidase, de hipoxantina para ácido úrico em um tecido reoxigenado. A severidade da lesão está relacionada com a duração da isquemia, possivelmente devido ao acúmulo de hipoxantina no tecido durante a isquemia.

Matsuda et al. (1998), Investigaram os efeitos do inibidor da xantina-oxidase, BOF-4272, na produção de citocina indutora de quimiotaxia de neutrófilos em ratos submetidos a lesão por isquemia e reperfusão hepática. A isquemia fora induzida por 30 minutos, ocluindo a veia porta. Um grupo de animais fora pré-tratado com inibidor



da xantina-oxidase ou heparina, cinco minutos antes do clampeamento. E concluíram que as células de kupffer diminuíram a quimiotaxia, em resposta à redução dos radicais livres de oxigênio, causada pela inibição da xantina-oxidase.

Rhodern et al. (1998), estudaram em ratos o efeito do aluporinol sobre a lipoperoxidação das membranas celulares renais na síndrome de isquemia e reperfusão, baseado no fato que vários estudos tem demonstrado que radicais livres de oxigênio contribuem para o dano celular decorrente da isquemia e reperfusão, desenvolveram este estudo com o objetivo de avaliar os efeitos da isquemia e reperfusão em ratos, tratados ou não com alopurinol, sobre a liporeoxidação das membranas celulares renais. Foram usados ratos wistar distribuídos em 4 grupos e submetidos à períodos de isquemia ou não, dependendo do grupo. Também foram submetidos ou não à tratamento com alopurinol na dose de 50 a 150mg/kg por via intraperitoneal 5 e 1 hora antes do procedimento. Na avaliação da lipoperoxidação utilizou-se a método de TBARS e QL. Os resultados demonstraram o aumento da lipoperoxidação nos animais submetidos a isquemia e reperfusão renal, porém estes efeitos deletérios foram reduzidos com o pré tratamento com alopurinol ( $p > 0,05$ ). Em conclusão os danos causados em animais submetidos à isquemia e reperfusão renal pode ser demonstrado e quantificado pela lipoperoxidação, e ainda o alopurinol mostrou proteger o rim contra o dano decorrente da isquemia e reperfusão, diminuindo a lipoperoxidação nestes animais. Então estes resultados sugerem que a via da xantina-oxidase é uma das mais importantes vias metabólicas envolvidas na geração de radicais livres de oxigênio, estes responsáveis em parte pelos danos funcionais do rim na síndrome de isquemia e reperfusão deste órgão.

Cunha et al., em 2005, motivados pela observação de que a isquemia prolongada dos tecidos leva a alterações na microcirculação e liberação de radicais livres do oxigênio, evento que pode resultar na morte do tecido, conhecido como o fenômeno do não refluxo. Propuseram um modelo em ratos de isquemia quente e reperfusão de membro posterior e estudaram os efeitos dos fármacos alopurinol na dose de 45 mg/kg e estreptoquinase na dose de 20000IU/kg. Realizaram a secção do membro posterior com preservação dos vasos e nervos em 110 ratos. O pinçamento vascular e posterior reperfusão após isquemia quente de 0, 2, 4, 6 e 8 horas e outros 3 grupos que receberam, alopurinol, estreptoquinase e a combinação de ambos, após 6 horas de isquemia. Como resultado foram observados que as taxas de viabilidade dos membros isquêmicos após sete dias foram no tempo 0 de



100%, com duas horas de isquemia de 80%, com quatro horas de 64%, com seis horas de 50% e com 8 horas de 20% e que as taxas de viabilidade dos membros nos 3 grupos tratados com fármacos variaram de 67% a 70%. Assim sendo os grupos tratados apresentaram maiores taxa de viabilidade que os membros com 6 horas de isquemia, porém não foram maiores do que os grupos com 2 e 4 horas de isquemia. Então, os resultados sugerem um aumento da viabilidade de membros após 6 horas de isquemia quando utilizados os fármacos alopurinol ou estreptoquinase e a associação destes não mostraram efeito adicional.

## 2.6 ENDOTOXINA BACTERIANA

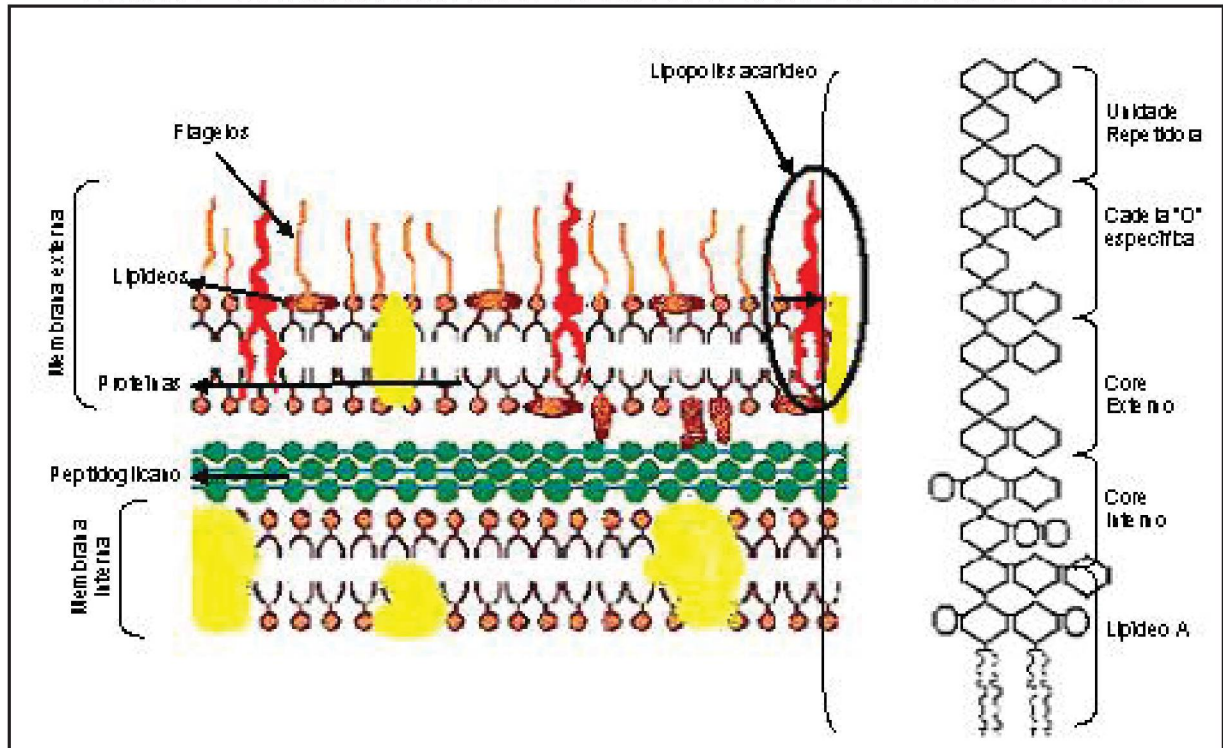
O estudo das bactérias e seus efeitos deletérios no organismo humano teve grande avanço no final do século XIX, quando os bacteriologistas passaram a estudar as substâncias excretadas por estes micro-organismos. estas substâncias, denominadas exotoxinas, tinham como ponto comum a inativação pelo aquecimento.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

A endotoxina é um componente da membrana externa da parede celular de bactérias gram-negativas. atualmente, o termo lipopolissacarídeo (LPS) passou a ser utilizado como sinônimo de endotoxina. há vários anos, a endotoxina é um produto biológico natural que fascina os pesquisadores (FREUNDENBERG e GALANOS, 1990). dependendo da dose, pode desencadear vários efeitos no hospedeiro. a liberação de grandes quantidades de endotoxinas pelas bactérias gram-negativas resultam em sepse e suas complicações: síndrome da resposta inflamatória sistêmica e choque séptico caracterizado por hipotensão, coagulação intravascular disseminada, falência de múltiplos órgãos e morte (PARILLO, 1993). Entretanto, existe contato permanente entre o organismo humano e o animal com a endotoxina, devido à presença de bactérias gram-negativas no trato gastrointestinal e na pele, estas pequenas quantidades de endotoxinas podem aumentar a resistência às infecções e apresentar atividade antitumoral (NOLAN, 1981).

Na Figura 1 visualiza-se o LPS que é uma toxina termoestável, composta por três subunidades: uma cadeia polissacarídica superficial, dita antígeno "O",

responsável pela variabilidade antigênica das bactérias gram-negativas, uma ponte também polissacarídica de localização intermediária e finalmente, o fosfolipídio a, inserido na membrana externa e responsável pela sensibilização do hospedeiro (FADEL, 1996).

FIGURA 1 - ESTRUTURA DA PAREDE CELULAR DE BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS



FONTE: O autor (2007)

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

A endotoxina (LPS), bem como os demais fragmentos de bactérias são capazes de induzir as células mononucleares humanas a produzir interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF), que são duas citocinas integrantes da resposta imune. Dentre os múltiplos efeitos biológicos da IL-1 destacam-se a febre (ação no hipotálamo), a neutrofilia (ação na medula óssea), a proliferação de colágeno (estímulo de fibroblastos), a liberação de aminoácidos de músculos, a produção de IL-2 (ação nas células T), e a produção de anticorpos (ação nas células B) (DINARELLO, 1984).



As endotoxinas interagem com vários sistemas celulares e humorais. Após penetrar na circulação, ligam-se a lipoproteínas plasmáticas, resultando em redução de sua atividade biológica. Mesmo assim ativam o complemento, induzem a coagulação, afetam a função hepática e o sistema neuroendócrino. Esta diversidade de respostas fisiológicas é direcionada à eliminação de endotoxinas, seus fragmentos, e até mesmo bactérias gram-negativas, e a seguir promover o reparo das lesões teciduais. Porém, devido às altas concentrações ou maior sensibilidade a endotoxinas, as ações dos sistemas de defesa tornam-se incontroláveis e, invés de contribuir muitas destas respostas acabam sendo deletérias ao paciente.

A resposta pirogênica é o efeito mais conhecido, mas apenas um dos vários efeitos produzidos por endotoxinas, elas também induzem os macrófagos do Sistema Retículo Endotelial (SRE) a liberar fatores antagonistas a glicocorticóide, fatores “insulina-like”, fatores coagulantes, os quais, em conjunto determinam piora do quadro clínico por estarem relacionados com coagulação dentro de capilares, liberação de prostaglandinas, óxido nítrico (indutor de vasodilatação sistêmica e hipotensão no choque endotóxico), superóxidos e enzimas lisossômicas. Enfim, estas substâncias introduzidas iatrogenicamente, na corrente circulatória de pacientes em hemodiálise produzem tantos efeitos e afetam tantos sistemas que tornam difícil precisar e caracterizar um diagnóstico (DINARELLO, 1989).

Jansen et al. 1991, descreveram um panorama geral do mecanismo indireto pelo qual atuam os produtos bacterianos, através de estudos com uma variedade de camundongo conhecida como C3H/HeJ. Como resultado de mutações genéticas espontâneas, estes animais não mostram nenhuma reatividade ao LPS. Demonstrou-se que o transplante de medula utilizando doadores normais compatíveis, tornava estes animais suscetíveis aos efeitos letais do LPS. Por outro lado, a utilização de doadores C3H/HeJ na reconstituição da medula de camundongos normais, produzia animais quiméricos que não respondiam ao LPS. Concluiu-se que o mecanismo de ação da endotoxina é indireto, sendo mediado por células hematopoiéticas. Outros trabalhos, como Lepine e Neugebauer (1995), mostram que esta molécula é, por si só, pouco tóxica, necessitando de mediadores endógenos para produzir a totalidade dos eventos observados durante o choque séptico.

Durante o processo infeccioso, o organismo agredido entra em contato com o lps no local da infecção e sistemicamente, através dos fragmentos bacterianos



presentes na corrente sanguínea, liberados por ocasião do crescimento e multiplicação bacterianos. após estudar a resposta de diversas células às endotoxinas, constatou-se que entre estas, os macrófagos são os mais ativados. Deitch et al. (1989) relatou que a endotoxina tem a capacidade de estimular as células de Kupffer a produzirem e liberarem citocinas como  $TNF\alpha$ , interferon  $\alpha/\beta$  e IL-1. A interação da endotoxina com os macrófagos é, provavelmente, o principal fator da resposta inflamatória e do choque endotóxico.

O principal receptor para o LPS é o CD14, que é uma glicoproteína presente na superfície dos macrófagos e monócitos. estudos com macrófagos normais e deficientes em CD14, mostraram que baixas doses de LPS necessitam da expressão do CD14, enquanto altas doses, podem desencadear a ativação dos macrófagos independente do receptor. Gangloff et al.(1999), determinaram se a variabilidade estrutural das moléculas de LPS, isoladas de diferentes espécies bacterianas, influenciavam a resposta dos macrófagos via receptores CD14. O estudo com LPS purificado de *escherichia coli*, *salmonella abortus-equi*, *salmonella minnesota*, *pseudomonas aeruginosa*, *neisseria meningitidis*, *bacteroides fragilis* e *rhodobacter sphaeroides* mostrou que a resposta dependente do CD14 requer um antígeno "O" específico, caracterizada por uma cadeia de carboidrato longa, com pelo menos 6 cadeias de acil no lipídeo a. o lps que não tem o antígeno "O" específico é caracterizado por uma cadeia de carboidrato curta indutora da ativação dos macrófagos, independentemente da presença receptor CD14.

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

de forças entre as citocinas pró e anti-inflamatórias depende a homeostase do organismo (FADEL, 1996).

A reação generalizada de shwartzman é caracterizada ecrose cortical renal bilateral, diátese hemorrágica e morte em 48 horas. experimentalmente, duas injeções endovenosas de lipopolissacarídeo, com intervalo de 24 horas, desencadeiam este quadro, o qual foi observado durante a prenhes de coelhas e ratas com apenas uma injeção endovenosa de lps, nos experimentos de Aplitz (1935); Viana (1948); Wong (1962).

Alexander et al. (1990), em seu trabalho sobre translocação bacteriana, redefiniu este fenômeno como sendo a passagem de micro-organismos viáveis e não viáveis pela mucosa intestinal e seus produtos como as endotoxinas. Vários fatores contribuem para aumentar a translocação bacteriana através da barreira intestinal. Estes incluem: 1-lesão direta dos enterócitos como ocorre com irradiações ou endotoxinas; 2-redução do fluxo sanguíneo ao intestino, que pode ocorrer em choque hemorrágico, infecções, queimaduras e administração de endotoxinas; 3-aumento da quantidade de micro-organismos que pode ocorrer em administrações de antibióticos ou antiácidos, seletivando flora bacteriana intestinal; 4-nutrição alterada que poderá ocorrer na administração de dietas elementares ou hiperalimentação parenteral. Os autores estudaram o processo de translocação bacteriana, utilizando *Candida albicans*, *Escherichia coli* ou endotoxina em alças intestinais de ratos e em cobaias.

Com os animais anestesiados, realizou-se enterostomia de 10 cm de comprimento no íleo distal. A continuidade intestinal foi feita com anastomose intestinal término-terminal com fio prolene® 6-0. Realizaram-se lesões térmicas no corpo dos animais (queimadura de terceiro grau em 50% da área corporal) e instilaram-se os micro-organismos e endotoxina nas alças intestinais. Os resultados demonstraram que a translocação de *C. albicans*, *E. coli* e endotoxina ocorreram por penetração direta nos enterócitos por meio de mecanismo desconhecido pelos autores. Este mecanismo não foi similar à fagocitose, porque os micro-organismos e a endotoxina estavam presentes no citoplasma dos enterócitos sem um revestimento de membrana como ocorre na fagocitose. A translocação entre os enterócitos (através das junções intercelulares) não foi observada. A passagem de *C. albicans* na lâmina própria parece estar associada à descontinuidade da lâmina basal e extrusão do citoplasma das células. Os organismos na lâmina própria foram



encontrados dentro de macrófagos (fagocitados) e também estavam livres em vasos linfáticos e sanguíneos. A endotoxina translocou por difusão através da lâmina própria e camada muscular do intestino, passando, em maior quantidade entre os miócitos do que através deles até a serosa.

Alexander et al. (1991) avaliaram a cinética bacteriana, sua distribuição tecidual e depósito de *E. coli* e de endotoxina translocados do intestino após lesão térmica. A cepa de *E. coli* utilizada cresceu na presença de glicose  $^{14}\text{C}$  e desta cepa retirou-se a endotoxina. A *E. coli* (dose de  $10^8$  a  $10^9$  de bactéria por animal) e endotoxina (dose de 100  $\mu\text{g}$  por animal) foram ministradas por sonda até a região estomacal de cada animal imediatamente antes da queimadura de 30% superfície corpórea. A translocação ocorreu extensivamente dentro de 1 hora após a lesão. Isto ocorreu com maior intensidade nos linfonodos mesentéricos, seguido pelo baço, pulmão e fígado. A translocação de endotoxina foi similar a translocação de bactéria intacta, com a exceção de que menos radioatividade foi verificada na cavidade peritoneal mas foi maior a radioatividade encontrada na região hepática. A morte das bactérias que translocaram foi maior nos linfonodos mesentéricos e baço (95 a 99%). Nos pulmões havia maior número de bactérias viáveis. Os autores concluem que a medida do número de bactérias viáveis num tecido não pode estimar a quantidade de translocação bacteriana.

Koike et al. (1994) estudaram ratos com a intenção de verificar se a endotoxemia produz falência de órgãos à distância. A intenção dos autores foi verificar se a isquemia e reperfusão intestinal resultam em endotoxemia e se a eliminação da endotoxina circulante atenua a ativação dos PMN e lesão pulmonar. O estudo foi prospectivo e randomizado. Os animais, anestesiados, foram submetidos à oclusão da artéria mesentérica superior por 45 minutos e após liberação desta artéria esperou-se por 2 horas de reperfusão. Eliminou-se a endotoxina circulante com imunoglobulina (IgM) murina, E5 específica, na dose de 3 mg/kg administrada por via endovenosa antes do estudo. Com 2 horas de reperfusão a quantidade inicial de neutrófilos circulantes foi determinada pela diferença na produção de superóxido com e sem estímulo ativador. A sequestração de neutrófilos no pulmão foi quantificada pela atividade da mieloperoxidase e pela razão entre a permeabilidade endotelial pulmonar e sanguínea da albumina  $I_{125}$ . As concentrações de endotoxina não foram significantes entre os grupos isquemia/reperfusão intestinal e grupo laparotomia. A isquemia e reperfusão intestinal leva ao aumento de neutrófilos



circulantes e acúmulo de PMN em nível pulmonar. Com isso, pode haver lesão deste órgão. Esses achados ocorreram no grupo onde foi eliminada a endotoxina circulante. Os autores concluem que a isquemia e reperfusão iniciam a ativação de neutrófilos circulantes, produzindo lesão pulmonar por mecanismo independente da endotoxina.

Granger (1988) descreveu o papel dos PMN e xantina-oxidase na lesão induzida pela isquemia e reperfusão. O autor relata que a reperfusão reintroduz o oxigênio no tecido isquêmico e este seria o principal responsável pela lesão tecidual. Havia sido demonstrado anteriormente, pelo autor, que a lesão na mucosa intestinal produzida por 3 horas de isquemia e 1 hora de reperfusão é significativamente maior que aquela produzida por 4 horas de isquemia sem reperfusão e também, a reperfusão de intestinos com perfusato desoxigenado após 3 horas de isquemia produziu menos lesão que quando reperfundido com sangue total. Os inibidores da xantina-oxidase desempenham importante papel em diminuir as lesões provocadas durante a reperfusão. O alopurinol, oxipurinol são drogas utilizadas por via endovenosa capazes de atenuar lesões intestinais em animais de laboratório provocadas pela reperfusão. Pela via entérica, o aldeído ptérico e o ácido fólico reduzem a permeabilidade microvascular intestinal provocada pela isquemia/reperfusão.

Yassin et al. (1996) realizaram estudos com ratos, quando o efeito da isquemia e reperfusão era verificado no intestino e na corrente circulatória. Para tanto, realizaram isquemia nos membros posteriores dos animais seguido de reperfusão. Avaliaram: mortalidade dos animais, estrutura morfológica intestinal, concentração de endotoxina sistêmica e a concentração plasmática de citocina IL-6. Utilizaram 60 ratos Wistar machos. A isquemia era realizada por meio de torniquetes: bandagens elásticas colocadas em ambos os membros posteriores dos animais na região da coxa. Após o período de isquemia, a reperfusão dos membros era obtida pela liberação dos torniquetes. No experimento um estudaram o grau de sobrevivência do grupo controle comparado com o grupo submetido à isquemia e reperfusão. Os animais foram observados por quatro dias. No experimento 2 havia três grupos de animais com doze animais cada. Grupo controle, grupo isquemia e grupo isquemia e reperfusão. Nestes eram colhidas amostras de sangue para dosar endotoxina sistêmica e concentrações de IL-6. Amostras de intestino delgado e grosso foram retirados para se obter estudo morfométrico da mucosa intestinal. Os

resultados demonstraram que a mortalidade aumentou significativamente, após 24 horas de reperfusão, aumento de 50% ( $p < 0,05$ ); em 72 horas, aumento de 70% na mortalidade ( $p < 0,005$ ). A espessura da mucosa intestinal, tanto do intestino delgado quanto do intestino grosso, tiveram significativo decréscimo no grupo submetido a 3 horas de isquemia seguido de 2 horas de reperfusão em comparação com o grupo controle e grupo submetido só à isquemia ( $p < 0,01$ ). Endotoxina plasmática aumentou significativamente nos animais do grupo isquemia com duas horas de reperfusão ( $44,8 \pm 19,2$  pg/ml) em relação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ); o mesmo ocorreu com os níveis de IL-6. Os autores concluem que a reperfusão de uma extremidade se acompanha de eventos intestinais que podem produzir resposta inflamatória sistêmica gerada por endotoxina de origem intestinal.

Os mesmos autores (Yassin et al., 1997), posteriormente, determinaram o efeito da isquemia e reperfusão em membros posteriores de ratos Wistar sobre a mucosa intestinal. Foi verificada sua estrutura e infiltração de PMN com o intuito de estabelecer o grau de lesão intestinal após indução de lesão isquêmica em órgão distante dos intestinos. Foi verificada microscopia eletrônica da mucosa intestinal, intestinos delgado e grosso, nos cinco grupos de animais: controle, grupo submetido só a anestesia, grupo só submetido a 3 horas de isquemia, grupo isquemia e uma hora de reperfusão, grupo isquemia e 2 horas de reperfusão e grupo isquemia e 3 horas de reperfusão. A avaliação histológica foi determinada por patologista que desconhecia o experimento. Para cada animal realizaram-se vinte medições dos parâmetros morfométricos intestinais: espessura total da mucosa, média de altura das vilosidades intestinais e da profundidade das criptas. Foi medido o número de PMN na lâmina própria de cada uma destas áreas intestinais para se estabelecer a quantidade de PMN por  $\text{mm}^2$ . A permeabilidade intestinal dos ratos normais foi previamente determinada em modelo de estudo chamado de “saco intestinal invertido”. Neste modelo utilizou-se  $^{14}\text{C}$  marcado com polietilenoglicol 4000 (PEG 4000 rad). Os resultados mostraram significante decréscimo na média da espessura da mucosa do intestino delgado nos animais submetidos à isquemia e com duas horas de reperfusão em comparação com o grupo controle. A profundidade das criptas diminuiu significativamente em animais submetidos à isquemia seguida de 2 horas e 3 horas de reperfusão em comparação com o grupo controle. No intestino grosso não foi detectada diferença na média da espessura da mucosa ou na profundidade das criptas em comparação com o grupo controle. A contagem de

PMN não mostrou significância entre os grupos controle em relação com os experimentais, tanto no intestino delgado quanto no intestino grosso. A permeabilidade intestinal aumentou significativamente no grupo isquemia, a que se seguiram de 2 horas de reperfusão, em relação ao grupo controle. O aumento de permeabilidade que ocorreu nos grupos com reperfusão afetou todos os segmentos intestinais. Os autores concluíram que a estrutura intestinal e permeabilidade podem ser alteradas com a reperfusão de órgãos distantes ao intestino, o que pode explicar relatos de endotoxemia em pacientes submetidos à cirurgia para corrigir aneurismas da aorta abdominal que evoluíram a óbito com complicações sistêmicas e falência de múltiplos órgãos.

Yassin et al. (1998), quantificaram a endotoxina sérica por meio de espectrofotometria e de teste imuno-enzimático, bem como determinaram a quantidade de anticorpo antiendotoxina. Estas determinações foram realizadas em cinco grupos de ratos. A isquemia seguida de reperfusão por uma, duas e três horas induziu significativo aumento de endotoxina, respectivamente: média de 10, 44,8 e 20,2 pg/ml comparados com aos controles 2,58 pg/ml e aos animais submetidos somente à isquemia 1,2 pg/ml ( $p < 0,05$ ). Este fato foi associado com significativa redução na concentração de anticorpos antiendotoxina (imunoglobulinas IgG e IgM). Não houve translocação bacteriana detectada em nenhum grupo estudado. Os autores concluem que apenas a isquemia e reperfusão de membros caudais de ratos, na ausência de infecção ou translocação bacteriana, é responsável pela ocorrência de endotoxemia.

Corson et al. (1992) realizaram trabalho com o propósito de testar se a isquemia e reperfusão de membros caudais de animais afetava a permeabilidade intestinal. Foram utilizados trinta ratos Wistar divididos em:

- grupo controle grupo I (com 10 animais);
- grupo II (houve 3 horas de isquemia);
- grupo III (isquemia por 15 minutos seguido de 15 minutos de reperfusão);
- grupo IV (isquemia por 3 horas seguido de 2 horas de reperfusão);

Os autores, ainda, testaram um grupo V no qual foram estudados os efeitos da hipotensão sobre a permeabilidade intestinal. Neste grupo, os animais, foram submetidos à infusão de nitroprussiato de sódio para manter a PAM ao redor de 75



mmHG. A isquemia foi realizada pelo método do torniquete com bandagem elástica na região proximal dos membros caudais dos animais. Para verificar a permeabilidade intestinal, os autores utilizaram segmento de intestino delgado (íleo terminal), que foi isolado com ligaduras de fio de seda. Neste foi administrado peroxidase (Sigma®) em 1 ml de solução salina 0,9% quinze minutos antes do sacrifício. Este segmento era retirado e preparado para ser examinado por microscopia eletrônica para verificar a ocorrência de rupturas na mucosa e evidências de penetração de peroxidase além das junções intercelulares dos enterócitos. Mediu-se também a endotoxina plasmática dos animais no início e após o fim do experimento. Os autores verificaram que a PAM dos animais sofria abrupta queda quando eram liberados os torniquetes ( $118 \pm 3$  mmHg para  $81 \pm$  mmHg), este fato foi simulado no grupo V com a administração de nitroprussiato de sódio. Na microscopia eletrônica verificou-se que a penetração da peroxidase na alça estudada foi evidente em 1 animal de cada um dos grupos I, II e III e em todos os animais submetidos à isquemia e reperfusão (grupo IV).

No grupo submetido à hipotensão (grupo V) não se evidenciou penetração de peroxidase além das junções intercelulares em todos os animais. Os níveis de endotoxinas circulantes aumentaram significativamente no grupo V em comparação com os grupos I, II e III. Os autores concluíram que os danos na mucosa intestinal são os responsáveis pela endotoxemia pós-isquemia e reperfusão e que estes danos não são atribuídos à hipotensão que ocorre no período de reperfusão.

Schumer et al. (1970) realizaram estudo para verificar se a presença de endotoxina de *Escherichia coli* dificultava a respiração mitocondrial (oxidação fosforilativa). Os autores, inicialmente, realizaram biópsias em fígados de pacientes que seriam submetidos à cirurgia das vias biliares. Posteriormente, injetaram LPS de *E. coli* 026:B6 (Difco Laboratories®) intraperitonalmente em ratos. O grupo controle dos animais recebeu soro pela mesma via. Após 18 horas, os animais foram sacrificados para se examinarem os fígados. As células hepáticas humanas foram separadas, a metade foi colocada *in vitro* com endotoxina e a outra parte serviu como controle. Mediu-se o consumo de oxigênio mitocondrial destes hepatócitos. Calculou-se a razão entre difosfato de adenosina e oxigênio (ADP/O) e o índice respiratório de controle (IRC). O IRC é igual à quantidade de oxigênio absorvida pela presença de ADP, dividida pela quantidade de oxigênio sem ADP. Os resultados

demonstraram que na presença de ADP a mitocôndria humana e a de rato com endotoxina tiveram absorção menor de oxigênio que os grupos sem endotoxina; contudo na ausência de ADP não houve diferenças significativas nos débitos respiratórios entre os grupos. Ambos IRC e ADP/O foram significativamente maiores para os grupos controles. Os autores verificaram alterações nas organelas citoplasmáticas na microscopia eletrônica dos grupos, onde a endotoxina estava presente; concluíram que a endotoxina de *E. coli* dificulta a respiração mitocondrial tanto *in vitro* quanto *in vivo* e que há forte correlação entre os dados de consumo de oxigênio e as alterações observadas pela microscopia eletrônica.

Com o objetivo de determinar o papel das citocinas e da ativação do sistema 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. (1989a) realizaram estudo em que utilizaram camundongos e ratos Sprague-Dawley. Para cumprir o primeiro objetivo, foram utilizados dois grupos de experimentos. No grupo I foi mensurada a capacidade da endotoxina de induzir translocação bacteriana em camundongos hiporresponsivos a endotoxinas, ou com deficiência de complemento. Camundongos heterogênicos foram usados para controle. No grupo II foi utilizado um anticorpo policlonal anti-TNF, para prevenir translocação bacteriana, induzida por endotoxina.

Nestes dois grupos, os camundongos receberam injeção de endotoxina de *Escherichia coli*, nas doses de 0,05 a 0,50mg por animal, 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 o linfonodo mesentérico e ceco para cultura, e fragmento do íleo para estudo histológico. Para a realização do segundo objetivo, isto é, a avaliação da permeabilidade da mucosa intestinal induzida por endotoxina, foram utilizados ratos, que durante a anestesia foram distribuídos aleatoriamente. Um grupo recebeu injeção de endotoxina de *Escherichia coli* (dose de 0,05 a 0,50mg); e o outro, injeção de SSI. Foi realizado a seguir, laparotomia com isolamento de segmento de 10 cm de jejuno e íleo.

Cada um destes segmentos foi cateterizado proximal e distalmente. Após as lavagens destes segmentos, as áreas isoladas retornaram para a cavidade. Uma



hora após a anestesia e injeção de SSI ou endotoxina, foi injetado 75 mCi de  $^{51}\text{Cr}$  EDTA na artéria carótida. O experimento durou 2 horas; durante este período, foi coletado sangue a cada 60 minutos, e líquido de perfusão intestinal a cada 10 minutos.

Também foi avaliada o tratamento prévio com alopurinol para prevenir o aumento da permeabilidade intestinal. Para isto, foi administrado alopurinol (dose 50 mg/kg) 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 linfonodo mesentérico numa porcentagem significativa, enquanto os que receberam injeção com SSI apresentaram linfonodos estéreis.

A maioria dos camundongos que receberam endotoxina apresentavam edema das vilosidades, no estudo histológico do íleo. O fato de a translocação bacteriana ocorrer nos camundongos hiporresponsivos à 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. Este fato foi reforçado pela observação de que, embora o tratamento prévio com anticorpo anti-TNF tenha sido efetivo em reduzir os níveis de TNF no plasma dos animais com injeção de endotoxina, 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 da liberação do  $^{51}\text{Cr}$  EDTA. Este aumento na permeabilidade ileal e na translocação bacteriana induzida por endotoxina poderiam ser prevenidos com a administração prévia de alopurinol, uma vez que ele foi efetivo em diminuir a incidência de translocação bacteriana e a permeabilidade intestinal quando comparados com os animais que não receberam a droga.

O alopurinol, inibidor competitivo da xantina-oxidase, previne a translocação e o aumento da permeabilidade intestinal, induzidos por endotoxina: isto sugere que a endotoxina promove translocação bacteriana primariamente por alterações da permeabilidade intestinal.

O'Dwyer et al. (1989), para estudar os efeitos da endotoxina na barreira intestinal, realizaram trabalho em 12 pessoas saudáveis. Aleatoriamente, os autores, administraram endotoxina de *Escherichia coli* (dose de 4 ng/kg) e solução salina.



Lactulose e manitol foram dados aos pacientes por via oral 30 minutos antes e 120 minutos após a endotoxina. Para quantificar a permeabilidade intestinal mediu-se a excreção renal destas substâncias nas 12 horas subsequentes. Após a administração sistêmica de endotoxina, a excreção de lactulose aumentou quase que duas vezes (média de  $263 \pm 36$   $\mu\text{mol}$  por 12 horas contra  $145 \pm 19$   $\mu\text{mol}$  por 12 horas durante administração de solução salina). A absorção de manitol teve comportamento similar porém com menor variação ( $5,7 \pm 0,3$  mmol por 12 horas contra  $4,9 \pm 0,3$  mmol por 12 horas). Após a administração de endotoxina os indivíduos apresentaram sintomas de estado gripal (cefaléia, mialgia, náuseas e calafrios), que começaram entre 60 e 90 minutos após a injeção e tiveram pico máximo entre 90 e 120 minutos. Houve aumento nas concentrações circulantes de cortisol e catecolaminas e também, nos pacientes que receberam endotoxina, houve leucocitose, 240 minutos após a injeção. Houve significativa correlação entre a excreção de lactulose e produção de norepinefrina, entre a excreção de lactulose e a contagem mínima de leucócitos.

Os autores sugerem que a exposição intestinal à endotoxina circulante aumenta a permeabilidade do intestino sadio e estas observações reforçam a hipótese de que pessoas enfermas em estados críticos, prolongadas e repetidas exposições à endotoxinas circulantes podem comprometer significativamente a integridade da barreira da mucosa intestinal.

## 2.7 SEPSE, FALÊNCIA DE MÚLTIPLOS ÓRGÃOS E TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

Até a presente data, grande quantidade de estudos clínicos, experimentais e laboratoriais têm acumulado evidências suficientes sobre a participação ativa da cascata inflamatória na gênese de quadros de falência de múltiplos órgãos.

A sepse está associada com o início e propagação de uma intensa cascata inflamatória, envolvendo células inflamatórias e mediadores imunológicos. Muitas destas células e mediadores foram identificados durante os últimos anos sendo as suas ações específicas, exploradas cuidadosa e intensamente. Mais recentemente os investigadores iniciaram a avaliação destes mediadores como ferramentas de diagnóstico e prognóstico em pacientes sépticos.

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

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

As endotoxinas podem estimular a liberação de várias citocinas, incluindo o fator de necrose tumoral alfa ( $TNF\alpha$ ), interleucinas 1, 6 e 8, os quais foram implicados na patogênese da sepse sendo estudadas as suas potencialidades diagnósticas e prognósticas de cada um destes mediadores. Muitos destes demonstraram resultados entusiasmadores, especialmente os níveis circulantes de IL-6, contudo, a avaliação destes mediadores na corrente circulatória de pacientes sépticos não ainda de uso rotineiro (ABBAS; LICHTMAN e POBER, 2000).

## 2.8 A TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

Classicamente se aceita que a mucosa do trato digestivo, além do papel secretório e absorptivo, constitui também barreira que isola o lume intestinal, com sua microflora, dos linfáticos mesentéricos e das vênulas tributárias do sistema porta. Não ocorre translocação bacteriana maciça em vigência de barreira epitelial intacta, defesas imunológicas competentes e microflora normal no trato gastrintestinal, que em conjunto evitam a superpopulação de patógenos, especialmente pelos bacilos entéricos, permitindo apenas um pequeno índice de translocação de microorganismos intestinais e de endotoxinas é um processo normal, até benéfico para estimular o sistema imunológico. E se essa barreira fosse vencida?

A primeira referência específica sobre este tema, provavelmente seja a publicação de Jacob, Weidel e Gordon em 1954, que relataram os efeitos da administração prévia de antibióticos não absorvíveis no aumento da sobrevivência de cães submetidos a choque hemorrágico experimental. Próximo a esta época, em 1957, LILLEHEI idealizou interessante modelo experimental em cães sob perfusão intestinal com sangue doado por outros animais, levados a choque por sangria e obtinham importante redução na taxa de letalidade, o que não se conseguia quando perfundiam-se seletivamente, ao invés dos intestinos, o fígado ou o cérebro do animal. Concluiu que o principal fator determinante da morte, no choque hipovolêmico, era a isquemia intestinal.

Seguiram-se trabalhos que não aderiram aos conceitos que começavam a surgir. Entre estes estudos, McNULTY em 1960, referiu letalidade similar em ratos que recebiam ou não antibioticoterapia, antes de se instalar choque hemorrágico experimental que era imediatamente revertido. Também NAGLERAL em 1961, não conseguiu comprovar atividade endotóxica em coelhos submetidos à sangria extensa. Estes estudos foram controversos, uma vez que a hipovolemia induzida nos animais deveria propiciar a TB do trato intestinal e a antibioticoterapia deveria diminuir ou inibir este fenômeno.

As observações mais superficiais das décadas de 1950 e 1960 estabeleceram fundamentos para os trabalhos contemporâneos, sofisticados, que procuram detalhar intimamente o processo de translocação bacteriana.

Deitch et al, em 1990, estudando a permeabilidade da mucosa intestinal a proteína marcada, em ratos, submetidos ou não à descontaminação seletiva com



penicilina e estreptomicina, observaram que após duas horas de ressuscitação do choque hipovolêmico, havia translocação bacteriana e aumento da permeabilidade intestinal à proteína marcada, sugerindo que os mesmos fatores que favorecem a translocação também alteravam a permeabilidade da mucosa, talvez rompendo as junções firmes que existem entre as células epiteliais, ficando clara nestas condições experimentais, a correlação entre a passagem da proteína marcada e a endotoxina pelas túnicas intestinais, ou seja, o processo de translocação pode ser acompanhado de passagem de endotoxinas, agravando a situação infecciosa.

Outro elemento hoje muito discutido é a célula de Kupffer que por um lado atuaria como “filtro” dos elementos que ultrapassassem a mucosa intestinal em situações de estresse, por outro, sob essas circunstâncias, produziria substâncias capazes de afetar a função dos hepatócitos (WEST; KELLER e HYLAND, 1985).

Entre os fatores que favorecem a translocação bacteriana, são citados: doenças inflamatórias intestinais, obstrução intestinal, isquemia, alterações da microflora e agressões diretas à mucosa como radioterapia e quimioterapia; agressões à mucosa por alterações sistêmicas como a hipovolemia, vasoconstrição, sepse e ainda as alterações térmicas (AMBROSE e JOHNSON, 1984; MOREHOUSE; SPECIAL e STWEART, 1986; DEITCH e BERG, 1987; GATHIRAM e GAFFIN, 1987; MA et al. 1989; RUSH; REDAN e FLANAGAN, 1989; HAJAR; REPKA e CANNAN JÚNIOR, 2002).

Nestas circunstâncias, os germes e as endotoxinas são fagocitados por macrófagos e vão ter aos linfonodos regionais. Uma grande carga de agentes agressores poderá ultrapassá-los e ganhar o ducto torácico e as veias tributárias do sistema porta; se passarem pelo fígado, atingirão o parênquima pulmonar.

Isso mostra que estudos de translocação que pretendam utilizar metodologia mais rigorosa devem incluir, além de amostras de tecido hepático amostras de gânglios mesentéricos e sangue.

A translocação bacteriana é definida como a passagem de bactérias viáveis ou não e seus produtos, do trato gastrintestinal para tecidos estéreis, muitos destas, destruídas pelo sistema de defesa, após ultrapassarem a barreira mucosa, algumas vezes nem chegando a ser identificadas laboratorialmente (BERG; GARLINGTON, 1979). As mais comumente isoladas são *E. coli*, *Klebsiella* sp, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* e enterococos (WEST; KELLER e HYLAND, 1985). Mais recentemente, HAJAR, REPKA e CANNAN

JÚNIOR em 2002, utilizaram como bactérias indicadoras apenas a *Escherichia coli* e o *Enterococcus faecalis*.

A obstrução intestinal é ótimo modelo para provar a translocação bacteriana, já que, nesses casos, é possível isolar germes nos gânglios mesentéricos, mesmo sem qualquer contaminação primária da cavidade peritoneal. O mecanismo pelo qual ocorre está relacionado à superpopulação bacteriana, aumento da permeabilidade intestinal e ruptura da barreira mucosa (DEITCH et al.1989).

Zeni Neto et al. (1997) estudaram a ocorrência de translocação bacteriana em ratos submetidos à oclusão intestinal do íleo terminal e do cólon descendente, com e sem isquemia e com isquemia isolada do íleo terminal. Os resultados permitiram concluir que ocorreu translocação bacteriana em ratos com oclusão intestinal do íleo terminal e do cólon descendente. Resultados semelhantes à laparotomia simples, com manipulação das alças intestinais, sendo a presença de isquemia do intestino delgado considerado por estes autores, um fator que aumenta significativamente o índice de translocação bacteriana. Tanto as agressões diretas, como as indiretas à mucosa intestinal, por si só, justificam a facilitação à passagem de micro-organismos.

Importante trabalho publicado em 1984 por Alexander mostra, por outro lado, que, num modelo de grande queimado em animal levado previamente a estado de desnutrição grave, a *Candida albicans* marcada com C14 passa diretamente por células intactas da mucosa (à microscopia eletrônica), provocando lesão de microvilosidades no ponto de penetração. Isso já ocorre 12 horas após queimadura. As endotoxinas marcadas, por sua vez, preferem a via intercelular. Com relação à *E. coli*, a translocação é bem mais precoce, uma hora após a queimadura. O íleo terminal e o ceco são os locais em que o fenômeno é mais intenso, embora ele ocorra em todo o intestino, delgado e grosso. Neste mesmo trabalho, fica clara a relação entre a translocação e o número de micro-organismos infundidos por gavagem refletindo a importância da superpopulação bacteriana patogênica no processo. Em particular, nos pacientes acometidos de grande redução do fluxo sanguíneo e disfunção entérica por jejum prolongado, situação comum em UTI, incide rápida atrofia da mucosa intestinal e perda de sua “função de barreira”. A penetração aumentada de germes e de endotoxinas ativa o sistema complemento a gerar grande número de produtos de degradação incluindo C3a, C3b, C3c e C3d, que são imunossupressores e aumentam a suscetibilidade a infecção bacteriana.

Além disso, esses produtos têm efeitos secundários, de natureza inflamatória, capazes de reduzir ainda mais o fluxo esplâncnico. Os germes e as endotoxinas também estimulam os macrófagos a produzir grande quantidade de citocinas (interleucina 1, interleucina 6, fator de necrose tumoral, fator ativador de plaquetas e produto ativador do ácido araquidônico – prostaglandinas, leucotrienos, lipoxinas e tromboxanos), que, em excesso, são capazes de produzir insuficiência de múltiplos órgãos, síntese de proteínas da fase aguda do soro e liberação de neurotransmissores, que causarão liberação de hormônios catabolizantes pelo pâncreas e pelas adrenais.

Assim, a translocação pode perfeitamente explicar aqueles casos de estado séptico hipermetabólico sem foco infeccioso aparente, situação relativamente comum no paciente grave.

## 2.9 FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF $\alpha$ )

Na revisão de Akamine et al. em 2004 afirmam que o lipopolissacarídeo bacteriano ligado aos receptores de membrana dos leucócitos mononucleares resulta na produção de diversas proteínas denominadas, genericamente, citocinas. As citocinas são glicoproteínas secretas por diversas células, sobretudo as mononucleares, agindo em nível local e sistêmico, controlando diversos processos de natureza hormonal, imune e inflamatória. São conhecidas atualmente cerca de 22 citocinas estruturalmente identificadas e com atividade biológica definida. Assim, existem 14 interleucinas (IL-1 à IL-14), três fatores estimuladores de colônias celulares (G-CSF/M-CSF e GM-CSF), dois fatores de necrose de tumor (TNF- $\alpha$  e TNF- $\beta$ ) e três interferons (IF- $\alpha$ , IF- $\beta$  e IF- $\gamma$ ). As citocinas são produzidas na dependência da estimulação por algum agente, havendo pouco ou nenhuma estocagem na maioria das células produtoras. Depois de secretadas, as citocinas agem intermediadas por receptores de membrana específicos, modulando a liberação e a atividade de outras citocinas, bem como de outras substância importantes na resposta inflamatória. A produção de citocinas é estimulada por toxinas bacterianas, complemento, imunocomplexos e por proteínas de superfície que surgem por dano na integridade do endotélio vascular. O conjunto de dados disponíveis até agora mostra que três citocinas são primariamente envolvidas na sepse: fator de necrose tumoral-alfa, interleucina-1 e interferon-gama.



O fator de necrose tumoral (TNF) é uma das citocinas mais estudadas, em virtude do seu papel central na cascata de eventos da sepse e do choque séptico. Os componentes da membrana celular envolvidos com as citocinas são constituídos por polipeptídeos glicosilados que têm uma porção externa (receptor) voltada para o meio exterior e uma porção interna (sinalizador) voltada para o citoplasma. Existem dois receptores de fator de necrose tumoral, estruturalmente pouco semelhantes, com pesos moleculares diferentes, de 55 e 75 quilodaltons. Os receptores de 55 quilodaltons são mais encontrados em células epiteliais e respondem pelos efeitos de citólise e citotoxicidade.

Já, os receptores maiores, de 75 quilodaltons, localizam-se predominantemente em células de origem linfóide e produzem proliferação celular, principalmente. Da mesma forma, existem o fator de necrose tumoral-alfa (caquexina) e o fator de necrose tumoral-beta (linfotóxina) que se ligam indistintamente a qualquer dos receptores. O fator de necrose tumoral é constituído pela repetição de uma sequência de aminoácidos formando um trímero. Cada monômero contém um ponto de ligação com o receptor, possibilitando um acoplamento eficaz somente quando três unidades de um mesmo tipo de receptor encontram-se unidas a cada uma das unidades do trímero. A porção sinalizadora interna dos receptores de fator de necrose tumoral não está bem documentada. Existe um agregado de aminoácidos frequentemente encontrado que não tem ainda função definida. No endotélio, as proteínas G acoplam-se ao sinalizador interno, mediando os efeitos do fator de necrose tumoral, fato não evidenciado em outros tecidos. Os processos intracelulares desencadeados por substâncias de importância biológica, entre elas, as citocinas, são geralmente mediados pela ativação de diversos mecanismos de agressão celular. As ações intracelulares de fator de necrose tumoral podem ser antagonizadas pela administração de substâncias antioxidantes, inibidores de proteólise e estimuladores de síntese protéica, fazendo supor um mecanismo múltiplo de ação dessa citocina (HENDERSON e WILSON, 1995).

Os receptores de fator de necrose tumoral existem em diversos tecidos, e pequenas quantidades de ácido ribonucléico mensageiro (RNAm) codificador são detectadas em diversas células de indivíduos normais, o que não significa uma atividade generalizada e constante da substância. O TNF produzido é rapidamente consumido pelos receptores celulares de superfície, não atingindo, portanto, a

circulação. Formas especiais de estudos demonstraram que a síntese do fator de necrose tumoral é mais acentuada no rim, baço, pulmão, útero, tuba uterina, pâncreas e coração. Estes órgãos são os principais alvos de agressão no choque séptico; no entanto, certos órgãos com o fígado e intestino, apesar de alto conteúdo de células potencialmente produtoras, mostram uma baixa capacidade de síntese do fator de necrose tumoral. A produção das citocinas é controlada por mais de um mecanismo. Os genes produtores de citocinas encontram-se inativos com parte do processo de desenvolvimento e maturação. No citosol de diversas células há um fator de transcrição do DNA chamado NF- $\kappa$ B, que se encontra normalmente bloqueado por um fator inibidor denominado I $\kappa$ B. Diversos processos produzem a fosforilação, liberando o NF- $\kappa$ B para transcrição do DNA e produzindo RNAm precursor de citocinas. Além deste mecanismo, a existência de características particulares do RNAm modula a síntese protéica. A presença de elementos do RNAm, ricos em unidades UA não sujeitos a translação, torna a molécula mais estável, possibilitando a produção de citocinas por mais tempo. Estímulos inespecíficos da síntese protéica podem também incrementar a produção de citocinas em até 20 vezes (ULEVITCH; TOBIAS, 1995).

Segundo Silva, Othero e Sogayar (2003) o conceito atual que a mitocôndria desempenha papel importante na fisiologia celular em outros planos que não somente aqueles relacionados à função dessas organelas como produtoras de ATP. Por exemplo, durante hipóxia a mitocôndria tende a “perder” parcialmente as formas reduzidas de oxigênio molecular, bastante conhecidas como radicais livres, e estes potentes oxidantes podem iniciar a via de transdução de sinais pró-inflamatórios, incluindo a ativação do fator nuclear de transcrição NF- $\kappa$ B, importante na regulação da expressão do fator de necrose tumoral.

Após interação da bactéria com a célula do hospedeiro, se inicia uma série de eventos destinados a debelar o processo infeccioso. Ao se considerar uma infecção por gram negativo, a resposta inflamatória se inicia após a interação LPS (endotoxina) com a proteína ligadora do LPS, a LBP (LPS binding protein). Este complexo liga-se ao receptor de membrana de monócito/macrófago denominado CD14. Este receptor CD14 não possui porção intracelular, tornando impossível a ativação celular. Com a descoberta dos receptores *Toll-like*, pôde-se entender como o complexo LPS-LBP-CD14 ativa a célula. Este receptor *Toll-like* ativa uma série de eventos intracelulares que culmina com a ativação do NF- $\kappa$ B e , por consequência,



ativação de genes relacionados à produção de citocinas. Seguindo este processo de interação entre bactéria e células do hospedeiro há uma coordenada e sistêmica reação inflamatória envolvendo componentes humorais e celulares. As células monocitárias desempenham importante papel inicial ao liberar de forma parácrina e endócrina muitos mediadores inflamatórios, especialmente IL-1, IL-6 e TNF e, a posteriori, IL-12, IL-5 e IL-8. Estes mediadores são liberados durante os primeiros (30-90min) minutos após a exposição ao LPS e, por sua vez, ativam um segundo nível de moléculas, incluindo outras citocinas, mediadores lipídicos, espécies reativas de oxigênio e moléculas de adesão que promovem a migração de células inflamatórias (polimorfonucleares) para diversos tecidos (COHEN,2002).

O fator de necrose tumoral associado a interleucina-1 desencadeia toda a sequência de eventos que constituem a sepse. Mudança de temperatura, variações da resistência e permeabilidade vascular, redução na contratilidade miocárdica, aumento da atividade da medula óssea e de diversas vias metabólicas são observadas após uma infusão do fator de necrose tumoral. A interleucina-1, por sua vez, produz febre, anorexia, sonolência, neutrofilia ou neutropenia, aumento dos fatores estimulantes de colônias e interleucina-6, aumento das proteínas de fase aguda, hipotensão arterial, redução dos níveis de toxina e catecolaminas, além de intenso extravasamento de líquido intravascular e depressão de diversos sistemas enzimáticos. O fator de necrose tumoral e a interleucina-1 estimulam a síntese e modulam a expressão de outras citocinas. De particular importância a interleucina-8, em diversos órgãos, recrutando e ativando leucócitos polimorfonucleares que causam dano tecidual e provocam disfunção orgânica. Finalmente, devemos lembrar que algumas das citocinas liberadas pela presença de endotoxina têm atividade anti-inflamatória predominante, diminuindo a síntese de interleucina-1 e do fator de necrose tumoral (AKAMINE et al., 2004).

As ações biológicas do TNF, do mesmo modo que as do LPS, são melhor entendidas como uma função de quantidade. Quando são produzidas pequenas quantidades, o TNF age localmente como um regulador parácrino e outócrino dos leucócitos e células endoteliais. As principais ações biológicas do TNF em baixas concentrações segundo Abbas, Lichtman e Pober (2000) são as seguintes:

- 1- o TNF faz com que as células endoteliais vasculares expressem novos receptores de superfície (moléculas de adesão) que fazem com que a



superfície celular endotelial torne-se aderente a leucócitos. Esta ação contribui para o acúmulo de leucócitos em locais de inflamação e provavelmente são os efeitos locais fisiologicamente mais importante do TNF;

- 2 - o TNF estimula os fagócitos mononucleares e outros tipos celulares a secretar quimiocinas que contribuem para o recrutamento leucocitário;
- 3 - o TNF ativa os leucócitos inflamatórios a matar os micróbios. É especialmente potente para ativar neutrófilos, porém também ativa eosinófilos e fagócitos mononucleares;
- 4 - A produção crônica em baixas concentrações de TNF induz ao remodelamento tecidual, agindo como um fator de angiogênese e como um fator de crescimento de fibroblastos;

Estes efeitos do TNF são essenciais para as respostas inflamatórias locais. Se o estímulo para a produção do TNF for suficientemente forte, são produzidas maiores quantidades de citocinas. O TNF entra na corrente sanguínea e age como um hormônio endócrino. As principais ações sistêmicas do TNF nas respostas fisiológicas do hospedeiro às infecções segundo Abbas, Lichtman e Pober (2000) são as seguintes:

- 1 - o TNF é um pirogênico endógeno que atua sobre as células das regiões reguladoras hipotalâmicas do cérebro para induzir a febre, esta ação é medida por um aumento da síntese das prostaglandinas;
- 2 - o TNF atua sobre os fagócitos mononucleares e talvez sobre as células endoteliais vasculares para estimular a secreção de IL-1 e IL-6;
- 3 - O TNF atua no hepatócito, aumentando a síntese de certas proteínas do soro como a proteína amilóide A. A combinação das proteínas plasmáticas derivadas do hepatócitos, induzidas pelo TNF em conjunto às induzidas pela IL-1 e IL-6, constituem a resposta de fase aguda aos estímulos inflamatórios;
- 4 - o TNF ativa o sistema de coagulação, primariamente por alteração do balanço entre atividades pró-coagulantes e anticoagulantes do endotélio vascular;
- 5 - o TNF suprime as células indiferenciadas da medula óssea;

6 - o TNF induz alterações metabólicas de caquexia, como a atrofia de células musculares e adiposas. A caquexia é devida em grande parte pela supressão do apetite induzida pelo TNF.

No campo da septicemia produzida por bactérias gram negativas, são produzidas quantidades maciças de TNF, a produção exacerbada de TNF pode induzir á morte por colapso circulatório e coagulação intravascular disseminada. De acordo com Abbas, Lichtman e Pober (2000) diversas ações específicas do TNF podem contribuir para seus efeitos letais nas concentrações extremamente elevadas:

- 1 - o TNF reduz a perfusão tecidual por depressão da contratilidade miocárdica;
- 2 - o TNF reduz ainda mais a pressão arterial por relaxar a musculatura lisa vascular, e estimula a produção de vasodiladores, como a prostaglandina e o NO, pelas células endoteliais;
- 3 - o TNF causa trombose intravascular induzindo uma redução na perfusão tecidual. Isto é devido a uma combinação de alterações nas células endoteliais e nos fagócitos mononucleares, o que promove a coagulação, e a ativação dos neutrófilos para formar agregados que induzem o tampoamento vascular feito por estas células. Estas ações mediados por TNF respondem por muitos efeitos da LPS observados nas reações de Shwartzman em coelhos e na coagulação intravascular disseminada em humanos;
- 4 - o TNF causa desequilíbrios metabólicos severos, como queda da glicemia até níveis incompatíveis com a vida. Isto é devido á hiperutilização da glicose pelo músculo e falha da reposição da glicose pelo fígado.

### 3 MATERIAL E MÉTODO

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Utilizaram-se 60 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar, com idades entre 123 a 138 dias e pesos de  $256,3 \pm 8,48$  gramas, provenientes do biotério da Universidade Federal do Paraná. Foram mantidos durante o experimento nas dependências da Coordenação de Ensino e Pesquisa do Hospital e Maternidade Angelina Caron. Foram observadas as seguintes normatizações:

- Princípios Éticos na Experimentação Animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA)
- Orientações sobre Validações de Resultados (INMETRO, NIT-DICLA 083)
- Nomenclatura Anatômica proposta por Walker e Homberger em 1997
- Normas para Apresentação de Trabalhos da Universidade Federal do Paraná (2007).

Este projeto foi aprovado em 31 de agosto de 2004 pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais do Hospital e Maternidade Angelina Caron, sob o registro nº 08/04 CEP/HAC (Anexo1). Os animais foram separados em grupos conforme descrito no Quadro 1:

QUADRO 1 – DEMONSTRATIVO DA ORGANIZAÇÃO DOS GRUPOS DO ESTUDO

Grupos	Subgrupos		N
Controle (C)	C-2h	Tratamento com solução fisiológica, isquemia 2 horas e reperfusão por 72 horas	10
	C-3h	Tratamento com solução fisiológica, isquemia 3 horas e reperfusão por 72 horas	10
	C-S	Tratamento com solução fisiológica, simulação da isquemia	10
Alopurinol (A)	A-2h	Tratamento com alpurinol, isquemia 2 horas e reperfusão por 72 horas	10
	A-3h	Tratamento com alpurinol, isquemia 3 horas e reperfusão por 72 horas	10
	A-S	Tratamento com alpurinol, simulação da isquemia	10

FONTE: O Autor (2007)



## 3.2 AMBIENTE DE EXPERIMENTAÇÃO

Após o recebimento, os animais foram separados em grupos de cinco, alojados em microambiente constituído por caixas de prolipropileno desinfetadas com hipoclorito de sódio a 1% contendo sepilho esterilizado. O conjunto caixa e sepilho eram trocados a cada 48 horas. Como macroambiente foram alojados em sala específica para animais de laboratório, com temperatura controlada entre 19 a 23°C, sob ciclos de iluminação automaticamente regulados a cada 12 horas, com exaustão forçada e receberam ração específica para a espécie (Nuvilab - Nuvital<sup>®</sup>) e água acidificada a pH 4,0 *ad libitum*. Durante este período foram procedidos exames parasitológicos de fezes, inspeção da pelagem para investigação de ectoparasitas, sendo descartados os animais portadores 4.

## 3.3 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS

### 3.3.1 Anestesia e preparação pré-cirúrgica

Após o período de adaptação dos animais foram programadas as cirurgias considerando-se os seguintes aspectos:

- jejum de ração por doze horas;
- esterilização de todos os materiais cirúrgicos e preparação das mesas;
- desinfecção ambiental da sala de cirurgia experimental com hipoclorito de sódio a 1% e manutenção da temperatura em 25°C±3;
- inspeção dos animais, pesagem em balança eletrônica (Ohaus<sup>®</sup>) e registro dos pesos em protocolo;
- cálculo das doses dos anestésicos conforme as seguintes proporções de 50mg/kg Cetamina (Ketamin<sup>®</sup>) associada a 10mg/kg Xilasina (Calmiun<sup>®</sup>) que foram administrados por via intramuscular na musculatura da panturrilha.
- após a indução anestésica foram submetidos à tricotomia ampla do abdômen, fixados em decúbito dorsal e submetidos à degermação com álcool iodado.
- colocação de campos cirúrgicos fenestrados esterilizados.

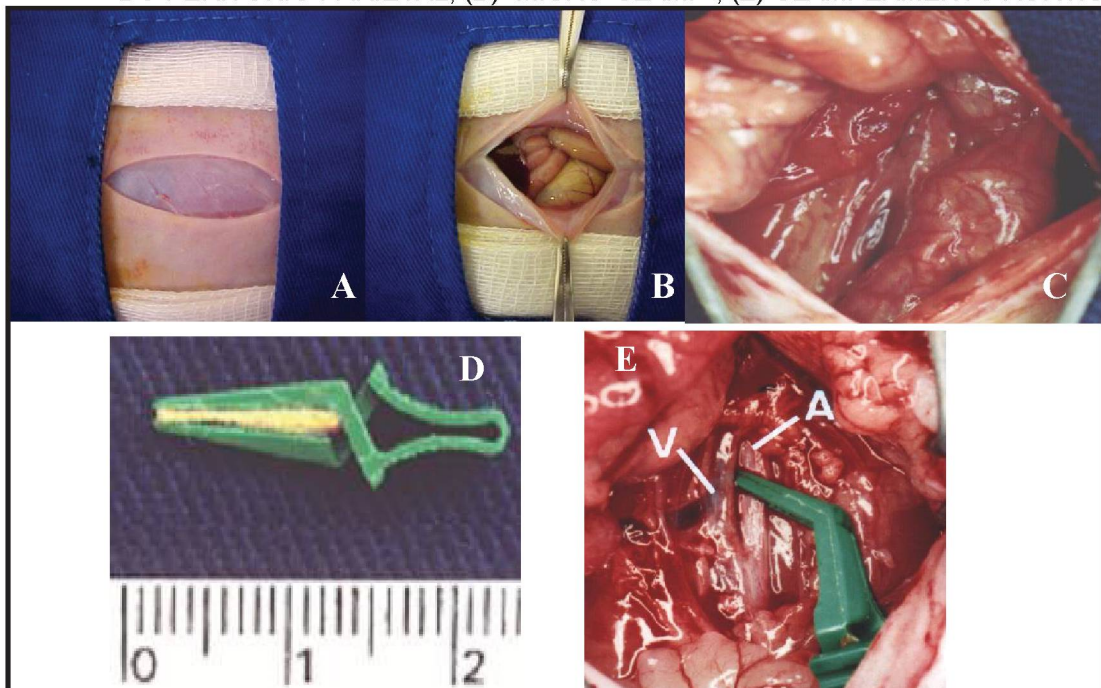
- mensuração da temperatura retal dos animais com termômetros clínicos.

Após os procedimentos cirúrgicos os ratos eram mantidos por 72 horas no mesmo ambiente específico anteriormente descrito, recebendo ração específica para a espécie (Nuvilab - Nuvital®) e água *ad libitum*.

### 3.3.2 Procedimentos cirúrgicos no grupo controle

Os ratos do grupo controle receberam por gavagem com sonda rígida, dose equivalente ao peso de solução fisiológica, uma hora antes do procedimento cirúrgico. Foi então procedida em cada rato uma laparotomia por incisão mediana xifopúbica com abertura de todos os planos da parede abdominal e exposição da cavidade abdominal. As alças intestinais foram tracionadas para fora da cavidade peritoneal e protegidas com gazes esterilizadas umedecidas em solução salina isotônica esterilizada. Com o auxílio de tesoura dissecou-se o peritônio parietal posterior e separou-se a veia cava da aorta infra-renal. Tais procedimentos podem ser visualizados na Figura 2,

FIGURA 2 - DEMONSTRAÇÃO DO ATO CIRÚRGICO : NOS DETALHES (A) LAPAROTOMIA POR INCISÃO MEDIANA XIFOPÚBICA, (B) ABERTURA DE TODOS OS PLANOS DA PAREDE ABDOMINAL E EXPOSIÇÃO DA CAVIDADE ABDOMINAL, (C) DISSECÇÃO DO PERITÔNIO PARIETAL, (D) "MICRO-CLAMP", (E) CLAMPEAMENTO AÓRTICO



FONTE: O autor (2007)

Conforme os subgrupos planejados (Tabela1), foram procedidos o clampeamentos aórticos por duas horas (subgrupo C-2h) e três horas (subgrupo C-3h) respectivamente. Durante estes períodos de isquemia foram tomadas as seguintes precauções:

- recolhimento das alças intestinais para a cavidade abdominal;
- aproximação das bordas das feridas cirúrgicas com três pontos de Vicryl® 000 (Johnson & Johnson) para evitar perda de líquido por evaporação;
- inoculação subcutânea na região dorsal de solução isotônica na dose de 3ml/kg/hora para manter a hidratação;
- mensuração da temperatura retal e aquecimento dos animais sob lâmpadas incandescentes;
- manutenção do plano anestésico quando necessário, com 25mg/kg Cetamina (Ketamin®) associada a 5mg/kg Xilasina (Calmiun®) que foram administrados por via intramuscular na musculatura da panturrilha.

Após os períodos de isquemia eram retirados os clampes e era procedido o fechamento da ferida cirúrgica por sutura contínua em dois planos com Vicryl® 000 (Johnson & Johnson).

No grupo C-S não foi procedida a isquemia, sendo somente feita a dissecação da veia cava da aorta infra-renal, manutenção por três horas e fechamento da ferida cirúrgica como anteriormente descrito.

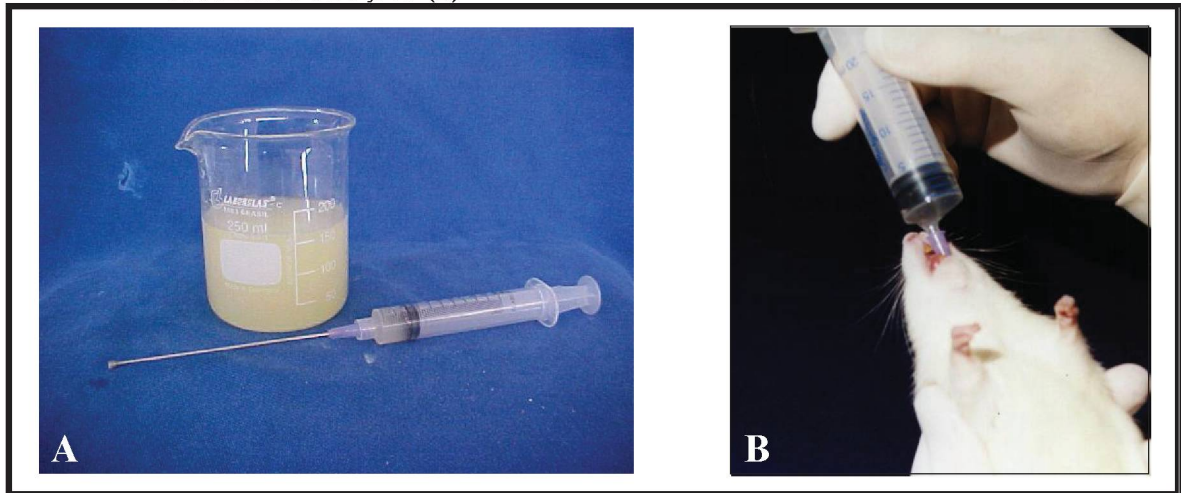
Todos os ratos eram remetidos ao biotério e mantidos por 72 horas recebendo ração específica para a espécie (Nuvilab - Nuvital®) e água *ad libitum*.

### 3.3.3 Procedimentos cirúrgicos no grupo alopurinol

Os ratos do grupo alopurinol receberam por gavagem com sonda rígida, dose de 100mg/kg de alopurinol uma hora antes do procedimento cirúrgico (Figura 3).



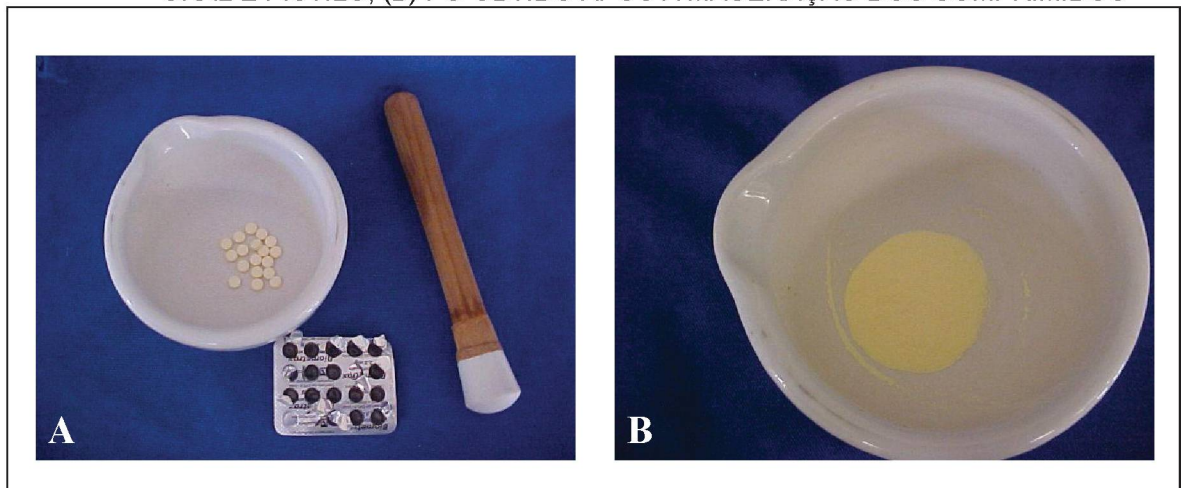
FIGURA 3 – INOCULAÇÃO POR VIA ORAL. EM DETALHE A SOLUÇÃO DE ALOPURINOL E A SONDA RÍGIDA UTILIZADA PARA INOCULAÇÃO ORAL (A) E A INOCULAÇÃO ORAL DA SOLUÇÃO (B)



FONTE: O autor (2007)

Esta solução foi preparada a partir de comprimidos do medicamento Zyloric® (Glaxo Wellcome) macerados e o pó obtido foi pesado em balança analítica de precisão (Mettler®) e solubilizado em solução fisiológica (Figura 4) e administrada para cada rato conforme o peso.

FIGURA 4 – MACERAÇÃO DOS COMPRIMIDOS DE ZYLORIC®, NO DETALHE (A) COMPRIMIDOS, GRAL E PISTILO, (B) PÒ OBTIDO APÓS A MACERAÇÃO DOS COMPRIMIDOS



FONTE: O autor (2007)

Todos os procedimentos cirúrgicos e as precauções tomadas foram similares àqueles do grupo controle, sendo que no grupo A-S não foi procedida a isquemia, sendo somente feita a dissecação da veia cava da aorta infra-renal, manutenção por 3 horas nas mesmas condições dos demais subgrupos e a seguir o fechamento da ferida cirúrgica também foi feito como anteriormente descrito. Todos

os ratos eram remetidos ao biotério e mantidos por 72 horas recebendo ração específica para a espécie (Nuvilab - Nuvital<sup>®</sup>) e água *ad libitum*.

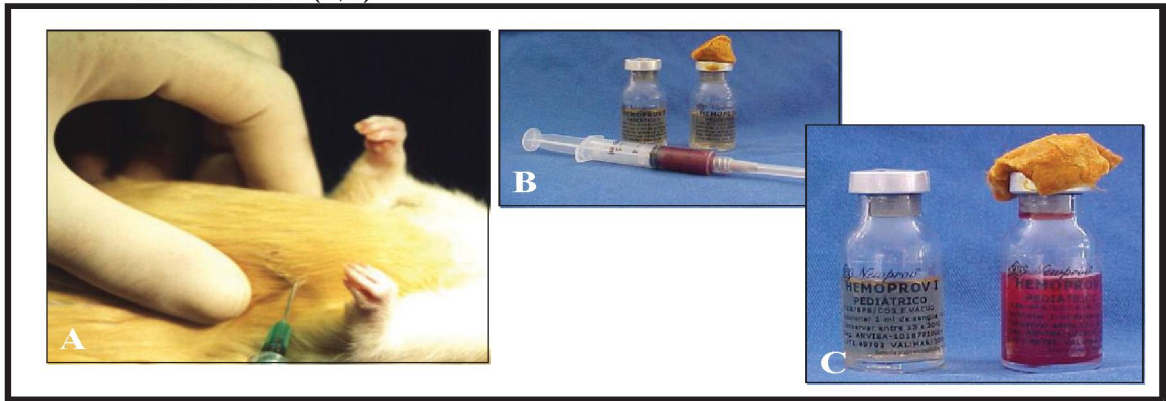
### 3.4. COLETA DE AMOSTRAS

Após as 72 horas dos procedimentos cirúrgicos, todos os ratos foram anestesiados com 50mg/kg Cetamina (Ketamin<sup>®</sup>) associada a 10mg/kg Xilasina (Calmiun<sup>®</sup>) foram feitos os seguintes procedimentos.

#### 3.4.1 Coleta de sangue (Figura 5)

- degermar a pele da região torácica com álcool iodado;
- funcionar o tórax do animal na posição em que se perceba os batimentos cardíacos;
- aspirar sangue com seringas de 20ml e agulhas heparinizadas, estéreis e apirogênicas até o volume para indução de parada cardíaco-respiratória;
- imediatamente substituíam-se as agulhas e o sangue era distribuído em frascos com meio de cultura (figura 4);
- para as hemoculturas eram inicialmente descontaminadas as tampas dos frascos de com álcool-iodado e semeadas em duplicatas de alíquotas de 0,5ml de sangue;
- o volume restante de sangue era transferido para tubos de ensaio esterilizados e despirogenados e centrifugados imediatamente a 1.000 rpm por 5 minutos;
- a seguir era separado o plasma e transferidos para três frascos de vidro (1ml em cada) identificados, esterilizados e despirogenados e conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$  até a oportunidade do processamento.

FIGURA 5 – COLETA DE SANGUE POR PUNÇÃO INTRACARDÍACA (A) E SEMEADURA EM MEIO DE CULTURA (B,C)



FONTE – O autor (2007)

### 3.4.2 Coleta de vísceras

Após a coleta de sangue, com os ratos mortos por exangüinação, foram executados os procedimentos descritos a seguir.

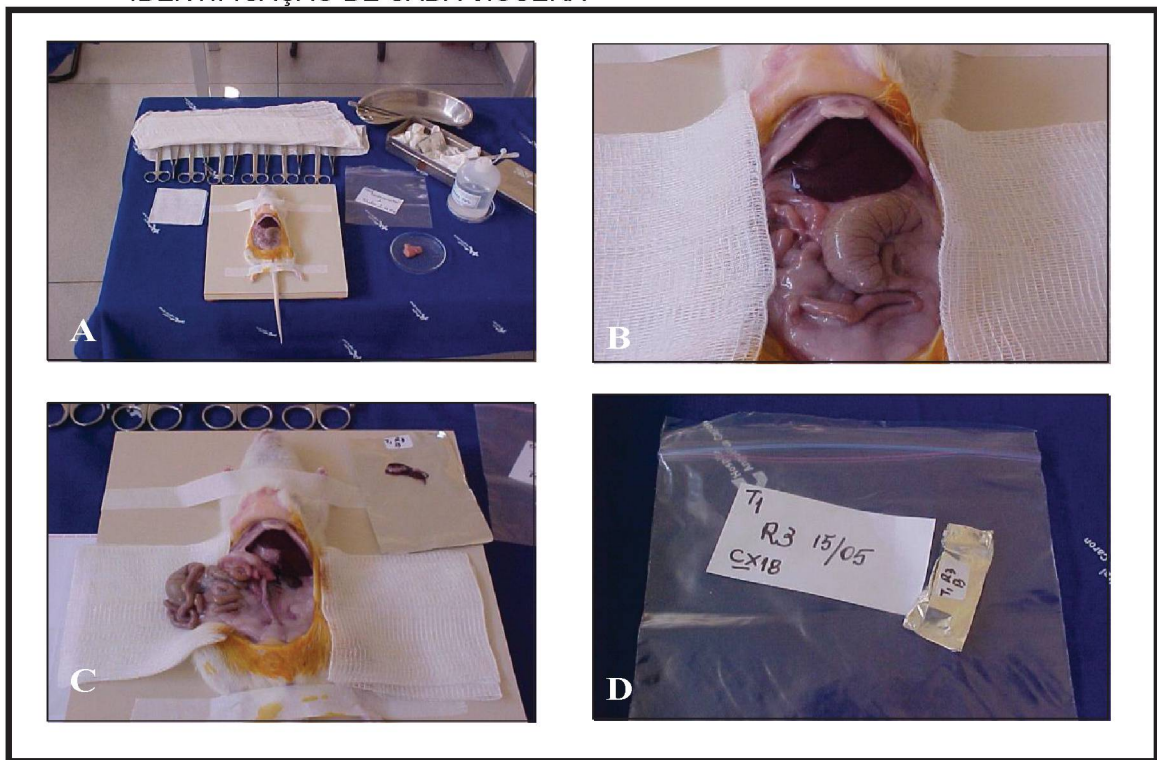
#### 3.4.2.1 Coleta de amostras para avaliação da translocação bacteriana (Figura 6), com os seguintes procedimentos:

- degermar a pele das regiões abdominal e torácica com álcool-iodado;
- proceder a abertura ampla da pele, em forma de cunha, retirando totalmente o retalho da pele, verificando a assepsia deste procedimento;
- degermar o tecido subcutâneo exposto com álcool-iodado;
- com auxílio de pinça e tesoura esterilizadas abrir igualmente toda a musculatura abdominal e retirar o retalho muscular correspondente;
- proceder inventário da cavidade, assinalando os seguintes achados macroscópicos: líquido livre em cavidade peritoneal, aderências do intestino delgado sobre a região isquemiada, presença de áreas intestinais enegrecidas;
- com novos jogos de pinças e tesouras esterilizadas, coletar: rins, baço, linfonodos mesentéricos (LNM), fígado e segmento intestinal, sempre nesta ordem;



- acondicionar cada uma das amostras coletadas individualmente em envelopes de papel alumínio esterilizados e o conjunto de amostras coletadas em saco plástico também esterilizado e identificado;
- remeter as carcaças para sacos plásticos apropriados e segregá-los conforme as normas de Biossegurança em freezer até a oportunidade de envio para a coleta de lixo hospitalar.

FIGURA 6 – COLETA DE VÍSCERAS: (A) ABERTURA DO ABDOMEM, (B) LOCALIZAÇÃO DAS VÍSCERAS, (C) RETIRADA E ACONDICIONAMENTO DAS VÍSCERAS (D) IDENTIFICAÇÃO DE CADA VÍSCERA

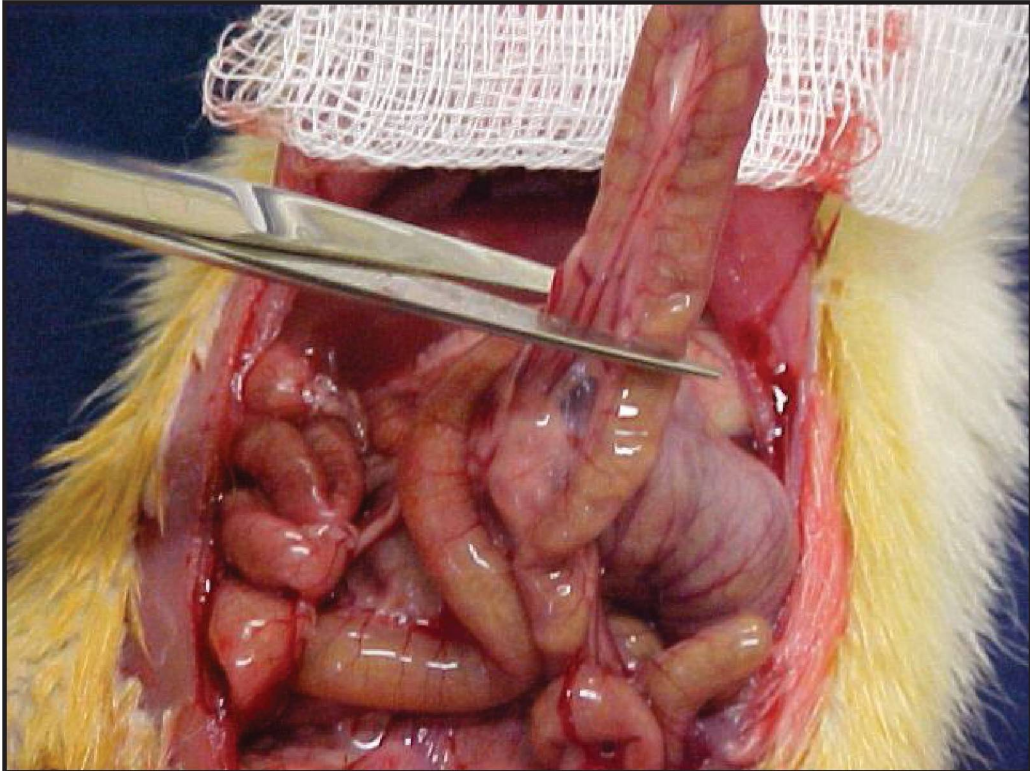


FONTE: O Autor (2007)

#### 3.4.2.2 Coleta de amostras para dosagens de TBARS

Após a coleta de amostras para avaliação da translocação bacteriana, procedia-se a ressecção de no mínimo 3 cm de cada um dos segmentos intestinais do reto, cólon e ceco (Figura 7).

FIGURA 7 – COLETA DE SEGMENTOS INTESTINAIS PARA A DOSAGEM DE TBARS



FONTE: O Autor (2007)

A seguir as amostras foram lavadas em solução salina isotônica para retirada de resíduos fecais, pesadas e homogeneizadas em solução aquosa de KCl 1,15% com gral e pistilo sobre tela de gramatura de 20 micra, na proporção de 1g de tecido para 9 ml de KCl e a seguir, o macerado de intestinos era centrifugado por 10 minutos à 1000xg em centrífuga refrigerada (SORVAL<sup>®</sup>), era separado o sobrenadante e descartado o sedimento.

### 3.5 AFERIÇÕES

#### 3.5.1 Dosagem de substâncias redutoras do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Teve por objetivo quantificar a ocorrência de lipoperoxidação ou peroxidação lipídica, secundária ao processo de isquemia e reperfusão, induzidas em fragmentos intestinais que é indicada pela formação de radicais livres, os quais reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), conforme a metodologia proposta por BUEGE e AUST (1978).

As amostras do macerado de intestinos foram previamente submetidas à dosagem de proteínas totais pelo método colorimétrico com azul de Comassie. Este

procedimento foi utilizado para referir os resultados das dosagens de substâncias redutoras do ácido tiobarbitúrico em mmoles /mg de proteína tecidual.

Para serem considerados válidos os resultados desta dosagem, foram feitas em triplicatas em dias diferentes e os resultados comparados estatisticamente pelo método de ANOVA para a verificação das diferenças. Após a avaliação estatística que teve como critério de aceitação dos resultados a ausência de diferenças entre as dosagens ( $p < 0,05$ ) foram obtidas as médias e desvios padrões representativos de cada subgrupo do estudo.

### 3.5.2 Dosagem de proteínas

Este método fundamenta-se na ligação do corante azul de Comassie (Comassie Brilliant Blue G-250 - SIGMA<sup>®</sup>), com moléculas de proteínas, formando um complexo de cor azul proporcional ao conteúdo de proteínas na amostra.

#### 3.5.1.1 Materiais

- Tubos de ensaio de polipropileno com tampas de rosca (FALCON<sup>®</sup>);
- Solução padrão de proteína (albumina bovina fração V SIGMA<sup>®</sup>) a 10mg/dl em solução tampão fosfatos pH 7,4);
- Micropipetas automáticas e ponteiros (GILSON<sup>®</sup>) de 100 a 1000 µl;
- Sobrenadante do macerado de tecido intestinal;
- Reagente de cor (solução alcoólica de Coomassie a 1%).

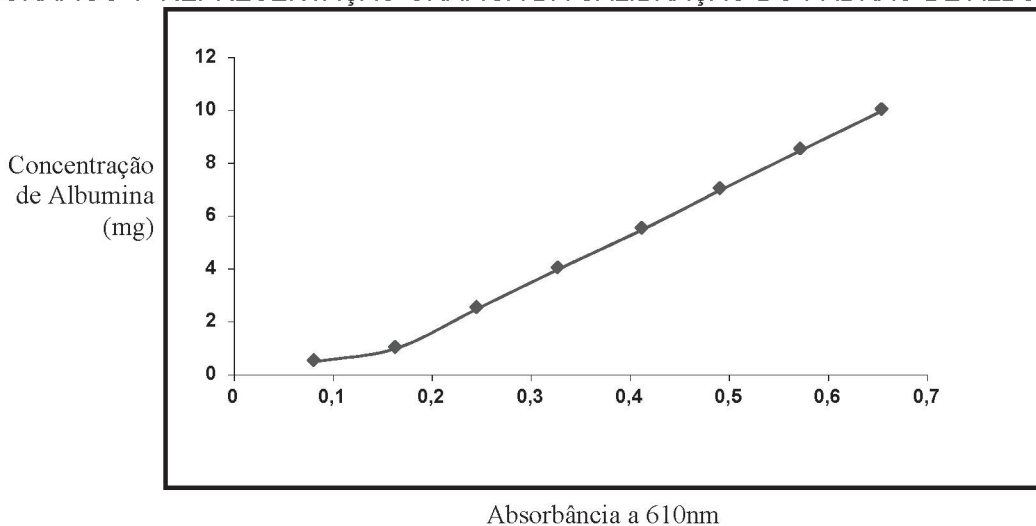
#### 3.5.1.2 Procedimentos

- Colocar 2ml do reagente de cor em todos os tubos identificados como (P: Padrão, B: Branco e T: Testes);
- Colocar 200 µl do padrão no tubo P, homogeneizar;
- Colocar 100 µl de cada macerado de intestinos em cada tubo T identificado conforme a amostra e homogeneizar;
- Ler no espectrofotômetro a 610nm, lâmpada de Tungstênio (W) e sensibilidade 1;



- Colocar o branco na primeira célula passar o botão para A<sub>2</sub> e regular a ABS para zero. As leituras de absorvâncias do extrato devem ser multiplicadas por 2;
- Interpolar as leituras na curva de regressão linear (Curva de Calibração , conforme ilustra o Gráfico 1);
- Dividir a leitura do extrato pela leitura do padrão, dividir o resultado por 100 (pois o padrão encontra-se em dl), expressar o resultado em mg/100 µl.

GRÁFICO 1- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE ALBUMINA



FONTE: O Autor (2007)

### 3.5.3 Dosagem de TBARS

Seguiu-se a metodologia proposta por Buege e Aust (1978), segundo a qual a lipoperoxidação ou peroxidação lipídica em fragmentos intestinais é indicada pela formação de radicais livres, que reagem com o ácido tiobarbitúrico (TBARS), sendo seu valor expressado em nanomoles por miligrama de proteína no tecido avaliado (nmol/mg de proteína). Estas dosagens foram feitas em triplicatas, em dias diferentes e após a validação dos resultados (item 3.6.1) os valores finais foram calculados pelas médias das três dosagens.

#### 3.5.2.1 Materiais

- Solução de Cloreto de Potássio (REAGEN<sup>®</sup>) a 1,15%;

- Solução de Ácido Tiobarbitúrico (SIGMA<sup>®</sup>) a 0,6%;
- Solução de Ácido Fosfórico (REAGEN<sup>®</sup>) a 1%;
- N-butanol (REAGEN<sup>®</sup>).

### 3.5.2.2 Procedimentos

- Incubar 0,5 ml do sobrenadante do macerado intestinal com 1ml de ácido tiobarbitúrico e 3 ml de ácido fosfórico à 100°C durante 45 minutos;
- Adicionar 4 ml de N-butanol e agitar por 2 minutos em agitador automático;
- Centrifugar por 10 minutos a 3.000 rpm;
- Ler a formação de um pigmento rosa em espectrofotômetro a 535 nm;
- A concentração TBARS foi calculada através do coeficiente de extinção molar de  $1,56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

## 3.6 AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

Esta avaliação tem como princípio o isolamento das bactérias entéricas *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* em amostras de sangue e macerados de vísceras e linfonodos abdominais.

### 3.6.1 Validação dos resultados

Para serem considerados válidos os resultados desta avaliação, foram feitas em duplicatas simultaneamente e os resultados dos isolamentos das bactérias entéricas *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* nas amostras deveriam ser semelhantes. Também se utilizou como critério de validação o isolamento destas bactérias nas amostras de intestinos, como indicadores da pré-existência destas bactérias na flora entérica dos ratos.

### 3.6.2 Hemoculturas

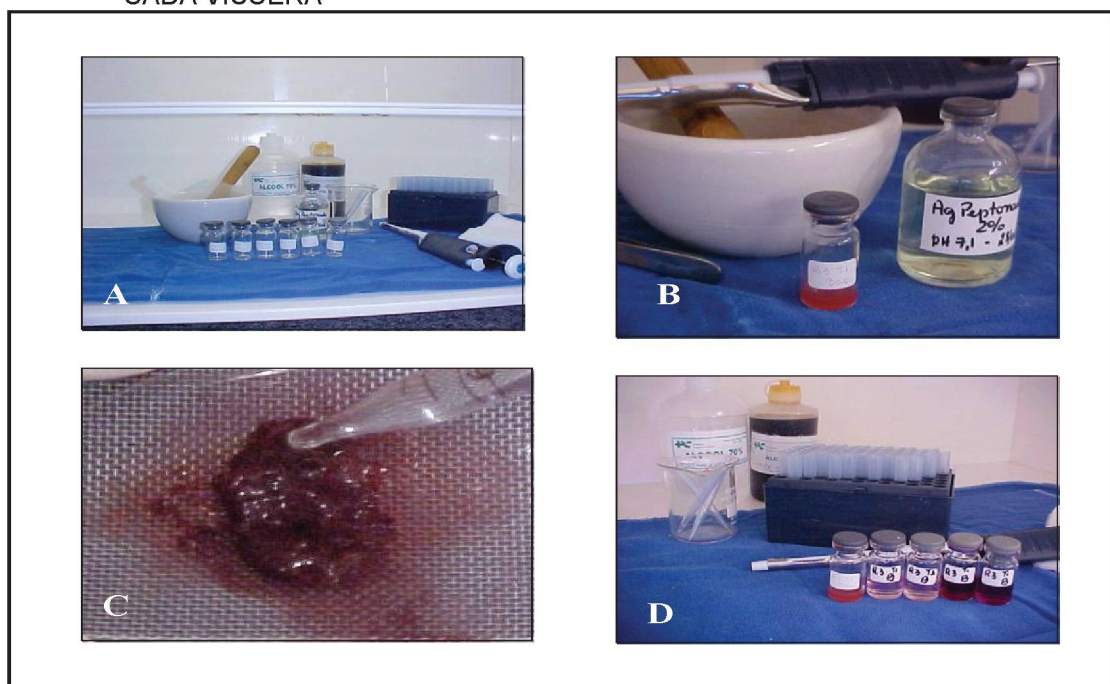
Semear em duplicata para cada amostra 1ml de sangue em meio de cultura (Caldo Infusão de Cérebro e Coração – Newprov<sup>®</sup>) e incubar a 37° por sete dias. Os frascos que apresentassem turvação ou sinais de crescimento bacteriano eram selecionados e submetidos à pesquisa de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, conforme descrito nos itens 3.6.4 e 3.6.5.

### 3.6.3 Preparação das amostras (Figura 8)

As amostras foram preparadas conforme a metodologia a seguir:

- triturar de cada órgão separadamente, sobre tela de nylon esterilizada com 20 $\mu$  de porosidade;
- diluição do macerado em 5ml de água peptonada a 2%;
- semear em duplicatas 0,5ml deste macerado em meios de cultura para a pesquisa de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*.

FIGURA 8 – PROCESSAMENTO DE VÍSCERAS : (A) MATERIAIS A SEREM UTILIZADOS DENTRO DA CABINE DE FLUXO LAMINAR, (B) GRAL, SOLUÇÃO AQUOSA DE PEPTONA A 2% E MEIO DE CULTURA, (C) MACERAÇÃO DA VÍSCERA (D) IDENTIFICAÇÃO DE CADA VÍSCERA



FONTE: O Autor (2007)



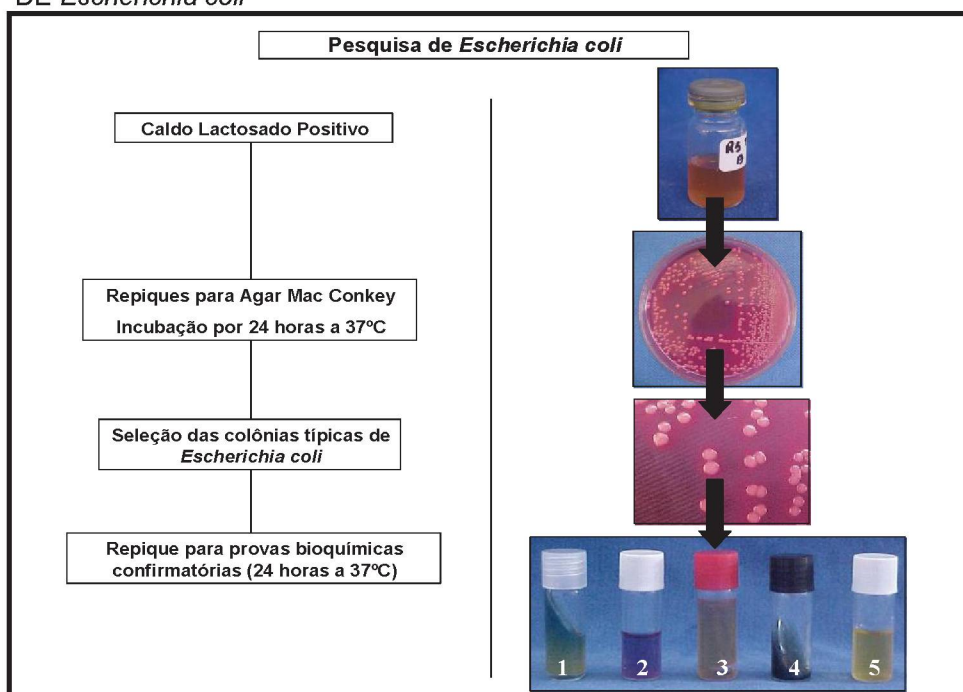
### 3.6.4 Pesquisa de *Escherichia coli* (Figura 9)

Foi empregado o caldo lactosado com indicador de pH - vermelho de metila, sendo semeados 1ml do macerado de cada víscera em cada um dos dois tubos com 10ml de meio.

Após incubação por 24 horas a 37°C e viragem de pH, eram selecionadas as amostras que não demonstraram crescimento nas primeiras 24 horas e foram incubadas até o sétimo dia para comprovação da negatividade. As amostras positivas foram semeadas em agar Mac Conkey (Difco®) para seleção de colônias lactose-positivas que eram evidenciadas pela colorações avermelhadas, típicas de *Escherichia coli* neste meio de cultivo após 24 horas de incubação a 37°C.

Ao término deste período, as colônias típicas foram submetidas à identificação bioquímica, através do kit para Enterobactérias (Newprov®) com cinco diferentes tubos, onde foi possível obter a leitura de dez provas bioquímicas, (fermentações de rhamnose e da glicose, l-triptofano-desaminase, gás sulfídrico, indol, mobilidade, ornitina, lisina, citrato e uréia) sendo assim caracterizadas as amostras de *Escherichia coli*, conforme descrito por Isemberg<sup>(63)</sup>. As amostras de sangue foram submetidas a esta triagem somente após demonstrarem crescimento no meio de triagem.

FIGURA 9 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DA METODOLOGIA DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Escherichia coli*



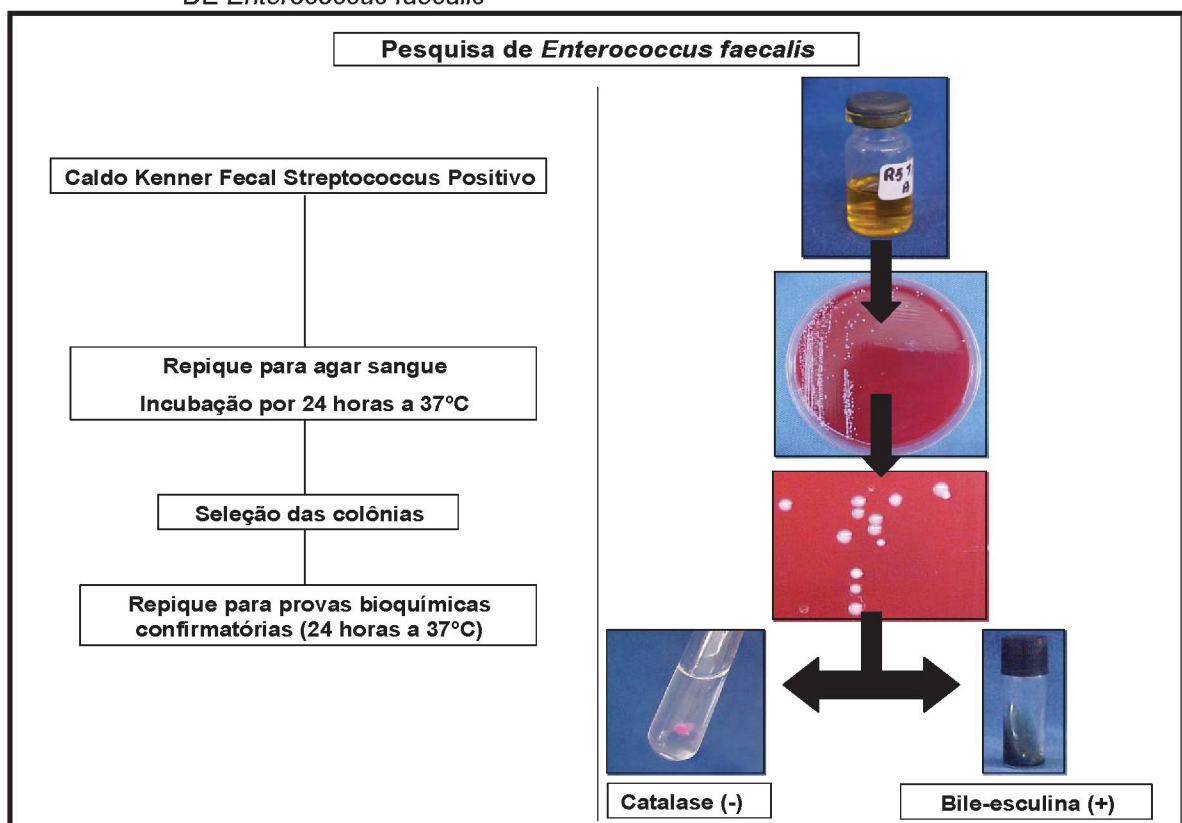
FONTE: O Autor (2007).

### 3.6.5 Pesquisa de *Enterococcus faecalis* (Figura 10)

Utilizou-se o *Kenner Fecal Streptococcus agar* (Difco®) suplementado com cloreto de trifeniltetrazolium (Merck® artigo 12.340) sendo semeados 1ml do macerado de cada víscera em cada um dos dois tubos com 10ml de meio e submetidas a 24 horas de incubação a 37°C. As amostras que não demonstraram crescimento nas primeiras 24 horas foram incubadas até o sétimo dia para comprovação da negatividade. As culturas positivas em *Kenner Fecal Streptococcus* foram repicadas para agar sangue e novamente submetidas a 24 horas de incubação a 37°C.

Ao término das incubações em agar sangue, as colônias foram selecionadas e emulsificadas em solução salina isotônica e procedidas as provas da catalase e hidrólise da esculina, sendo assim caracterizadas as amostras de *Enterococcus faecalis*, conforme descrito por Iseberg<sup>(63)</sup>. As amostras de sangue foram submetidas a esta triagem somente após demonstrarem crescimento no meio de triagem.

FIGURA 10 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA METODOLOGIA DE ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE *Enterococcus faecalis*



FONTE: O Autor (2007).

### 3.7 DOSAGEM DE ENDOTOXINAS EM AMOSTRAS DE PLASMA

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

#### 3.7.1 Materiais

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

#### 3.7.2 Procedimentos

##### 3.7.2.1 Preparação de materiais despirogenizados

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

##### 3.7.2.2 Preparação do reagente LAL

- O lisado foi reconstituído com água apirogênica no volume indicado pelo fabricante do reagente;
- Homogeneizou-se evitando a formação de espuma. Aliquotou-se, o lisado, com pipeta automática: 0,11ml do reagente LAL em tubos de hemólise. Os tubos foram conservados em freezer a -20°C.



### 3.7.2.3 Preparação da endotoxina padrão

- O liofilizado de endotoxina padrão foi reconstituído com água e materiais despirogenizados, conforme as orientações do fabricante. A solução padrão de endotoxina continha 50UE/ml, foi feita uma diluição inicial a  $10^{-1}$  para conter 5UE/ml, denominada diluição de uso;
- Foi preparada uma série de 10 tubos de ensaio despirogenizados nos quais foram distribuídos com pipeta automática, volumes de água apirogênica conforme descrição da Tabela 1;
- A seguir foram transferidos volumes de padrão de endotoxina padrão conforme descrito na Tabela 1. A cada diluição realizada, o tubo foi agitado em vórtex;
- Foram adicionados aos tubos 0,1ml do reagente LAL e incubou-se por uma hora em “banho-Maria” 37°C;
- A leitura foi realizada com a inversão dos tubos a 180°C. O resultado positivo foi indicado pela formação de gel que não se desprendia do fundo do tubo.

TABELA 1 - DILUIÇÕES DA ENDOTOXINA PADRÃO

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

FONTE: O Autor (2007).

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

#### 3.7.2.4 Análise qualitativa de endotoxina nas amostras de plasma de ratos

- Distribuiu-se 0,1ml da amostra em tubo contendo o reagente LAL. Realizou-se a prova com controle positivo (endotoxina padrão 5 UE/ml) e controle negativo (água apirogênica);
- Foi incubado a 37°C por 1 hora e após realizou-se a leitura. Se a amostra produzisse reação de gelificação, procedia-se à análise quantitativa, conforme descrito abaixo.

#### 3.7.2.5 Análise quantitativa de endotoxina nas amostras de plasma de ratos

- Realizaram-se diluições seriadas do plasma, com fator 2 de diluição 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 e 1/32, em água apirogênica;
- Distribuiu-se 0,1ml de cada diluição em tubos contendo 0,1ml do reagente LAL e incubou-se a 37°C por uma hora e realizou-se a leitura;
- Se a amostra produzir reação de gelificação, proceder ao cálculo de teor de endotoxina em unidades endotóxicas por mililitro de plasma, multiplicando a sensibilidade do reagente LAL (0,01953125UE) pela última diluição que produziu reação de gelificação.

### 3.8 DOSAGEM IMUNOENZIMÁTICA DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA (TNF $\alpha$ )

Esta dosagem emprega a técnica imunoenzimática quantitativa, conforme proposição de SPRONG et al. (1986), na qual um anticorpo monoclonal específico anti-TNF $\alpha$  é fixado em placa de Terazaki para posterior captura do antígeno TNF $\alpha$ . Foi empregado o conjunto de reativos BIOTRA Tumor Necrosis Factor ELISA System (Amersham Pharmacia code RPN 2718<sup>®</sup>).

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

### 3.8.1 Validação dos resultados

Para serem considerados válidos os resultados desta dosagem, foram feitas em triplicatas em dias diferentes e os resultados comparados estatisticamente pelo método de ANOVA para a verificação das diferenças. Após a avaliação estatística que teve como critério de aceitação dos resultados a ausência de diferenças entre as dosagens ( $p < 0,05$ ) foram obtidas as médias e desvios padrões representativos de cada subgrupo do estudo.

### 3.8.2 Materiais

- Placa de Terazaki sensibilizada com anticorpos monoclonais anti-  $\text{TNF}\alpha$  de rato;
- Padrão de  $\text{TNF}\alpha$  de rato;
- Anticorpos monoclonais anti-  $\text{TNF}\alpha$  de rato, conjugado à peroxidase;
- Peróxido de hidrogênio a 30%;
- Solução de ácido sulfúrico 10N;
- Solução tampão fosfatos pH 7,5;
- Solução tampão citrato pH 5,0;
- Espectrofotômetro para leitura de testes imunoenzimáticos;
- Ortofenilenodiamino.

### 3.8.3 Procedimentos

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



- Incubar 1 hora à temperatura ambiente;
- Esvaziar o conteúdo da placa por inversão e lavar três vezes com tampão fosfatos pH7,5;
- Distribuir 20 µl de peróxido de hidrogênio a 30%, em cada um dos orifícios;
- Distribuir 10 µl de Ortofenilienodiamino (50mg em 25ml de tampão citrato pH5,0) e incubar por 15 minutos;
- Adicionar em cada orifício 10µl de ácido sulfúrico 10N;
- Ler a absorbância do conteúdo de cada orifício em espectrofotômetro a 450nm e calcular o coeficiente de correlação entre a concentração do padrão de TNF e as absrobâncias lidas (Tabela 2);
- Interpolar as leituras dos padrões de TNF $\alpha$  de rato às leituras das amostras;
- Calcular por regressão linear a quantidade de TNF $\alpha$  presente nas amostras em picogramas/ml (Gráfico 2).

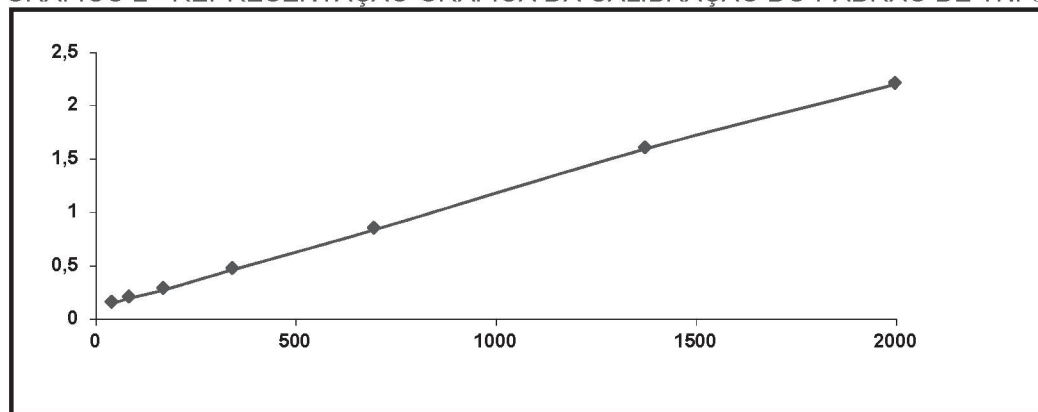
TABELA 2 – PREPARAÇÃO DAS DILUIÇÕES DO PADRÃO DE TNF $\alpha$  PARA CALIBRAÇÃO DO MÉTODO

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

Coeficiente de correlação = 0,9873

FONTE: O Autor (2007)

GRÁFICO 2 - REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DA CALIBRAÇÃO DO PADRÃO DE TNF $\alpha$



Concentração do padrão de TNF (pg/ml)

FONTE: O Autor (2007).

### 3.9 AVALIAÇÕES ESTATÍSTICAS

Os resultados dos grupos foram expressos sob a forma de média e desvio-padrão, obtidos entre as triplicatas nas dosagens de substâncias redutoras do ácido tiobarbitúrico (TBARS), fator de necrose tumoral alfa e pesquisas de bactérias indicadoras de translocação bacteriana.

Previamente aos cálculos destas médias, os resultados foram comparados estatisticamente pelo método de ANOVA para medidas repetidas, com o intuito de verificar se havia diferença entre as determinações das triplicatas ( $p < 0,05$ ) de uma mesma amostra, em não havendo diferença ( $p > 0,05$ ) é que eram calculadas as média e desvios-padrão.

Para as dosagens de endotoxinas estes resultados foram obtidos entre as duplicatas destas dosagens. Este processo foi denominado de validação dos resultados, conforme orientação do INMETRO, através da norma NIT-DICLA 083.

#### 3.9.1 Comparações entre os grupos

Aplicou-se a análise de variância ANOVA e para comparações pareadas entre grupos o teste de Tukey a fim de verificar quais grupos diferiam entre si. O teste de Tukey sendo um teste de comparações múltiplas, associado à análise de variância, permitiu a determinação do valor da diferença mínima entre as variáveis, que era estatisticamente significativa para o nível adotado de 5%. O programa utilizado foi GraphPad InStat Demo (DATASET1.ISD).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DOSAGENS DE SUBSTÂNCIAS REDUTORAS DO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO (TBARS)

#### 4.1.1 Validação dos resultados das dosagens de TBARS

A ausência de diferenças entre os resultados das triplicatas (A, B e C) das dosagens de TBARS nas amostras visualizadas na Tabela 3 conforme especificação constante no Anexo 2 e Anexo 3, permitiu validá-los e adotar a média e desvio-padrão de todas as dosagens como representação de cada subgrupo para esta aferição.

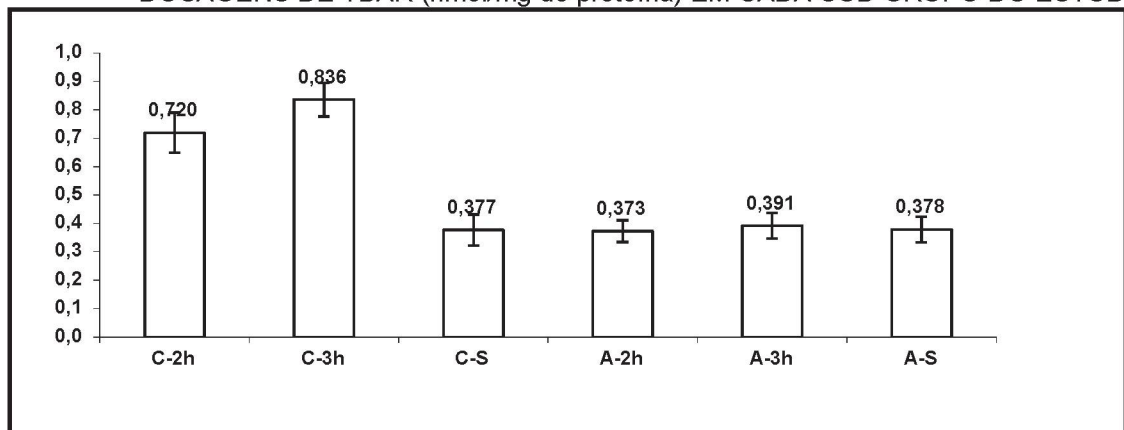
TABELA 3 – DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÕES DAS DOSAGENS DE TBARS (nmol/mg de proteína) EM AMOSTRAS DE INTESTINO DE RATOS

Grupos e Subgrupos	Controle			Alopurinol		
	C-2h	C-3h	C-S	A-2h	A-3h	A-S
Média	0,720	0,836	0,377	0,373	0,391	0,378
Desvio-padrão	0,070	0,059	0,055	0,038	0,045	0,045

FONTE: O Autor (2007).

Conforme demonstrado no Gráfico 3, entre os ratos do grupo controle, submetidos a duas horas de isquemia a média obtida foi de  $0,720 \pm 0,070$ , no subgrupo submetido a três horas de isquemia foi  $0,836 \pm 0,053$  e no subgrupo controle-simulação foi  $0,377 \pm 0,055$ . Os resultados obtidos no grupo alopurinol, em seus subgrupos submetidos a duas e três horas de isquemia e simulação foram respectivamente,  $0,373 \pm 0,038$ ,  $0,391 \pm 0,045$  e  $0,378 \pm 0,045$ .

GRÁFICO 3 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÕES OBTIDOS NAS DOSAGENS DE TBAR (nmol/mg de proteína) EM CADA SUB-GRUPO DO ESTUDO



FONTE: O Autor (2007).



#### 4.1.2 Comparações entre as médias e desvios padrões das dosagens de TBARS (Mmoles/mg de proteínas) nos subgrupos

Uma vez que as amostras estavam validadas foram realizadas comparações entre as médias das dosagens de TBARS (TABELA 4), em amostras de intestinos de ratos, dos subgrupos do estudo. Estas comparações analisadas estatisticamente pelo método de ANOVA estão demonstradas nos Anexos 9 e 10.

TABELA 4 – AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA PELO MÉTODO DE ANOVA NAS MÉDIAS DAS DOSAGENS DE TBARS, EM AMOSTRAS DE INTESTINO DE RATOS, NOS SUBGRUPOS DO ESTUDO

Comparações	Subgrupos		p
Entre os subgrupos controle-simulação	Controle (C-S)	X Alopurinol (A-S)	>0,05
		X C-2h	<0,001
Entre simulação e os subgrupos isquemia de cada grupo	Controle (C-S)	X C-3h	<0,001
		X A-2h	>0,05
	Alopurinol (A-S)	X A-3h	>0,05
		C-2h X C-3h	<0,001
Entre os subgrupo isquemia	A-2h X A-3h	>0,05	
	C-2h X A-2h	<0,001	
	C-3h X A-3h	<0,001	

FONTE:O Autor (2007).

Quando foram comparadas médias entre os subgrupos controle-simulação e o aluporinol-simulação não houve significância estatística ( $p>0,05$ ).

Na avaliação entre os grupos, quando foram comparados os subgrupos entre si, observou-se significância estatística ( $p<0,001$ ) entre C-S x C-2h, entre C-S x C-3h, entre C-2 x C-3h, entre C-2h x A-2h, entre C-3 x A-3h e não houve diferença estatística ( $p>0,05$ ) entre C-S x A-S, entre A-S x A-2h entre A-S x A-3h e entre A-2h x A-3h.

## 4.2 DOSAGENS DE ENDOTOXINAS

### 4.2.1 Validação das dosagens de endotoxinas

Não foram detectados endotoxinas nos subgrupos C-S e A-S, já nos subgrupos C-2h e C-3h as médias foram respectivamente de  $0,0429\pm 0,062$  UE/ml e  $0,1092\pm 0,0513$  UE/ml e nos subgrupos A-2h e A-3h as médias encontradas foram de  $0,0117\pm 0,0188$  UE/ml e  $0,0195\pm 0,0275$  UE/ml, conforme demonstrado nas Tabelas 5 e 6 e representadas no Gráfico 4.

TABELA 5 – DEMONSTRATIVO DOS RESULTADOS OBTIDOS NAS DOSAGENS DE ENDOTOXINAS

Ratos	Controles						Alopurinol					
	C-2h		C-3h		C-S		A-2h		A-3h		A-S	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	0,039	0,039	0,156	0,156	ND*	ND	0,039	0,039	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	0,039	0,039	ND	ND	ND	ND	0,039	0,039	ND	ND
3	ND	ND	0,156	0,156	ND	ND	ND	ND	0,078	0,078	ND	ND
4	0,039	0,039	0,156	0,156	ND	ND	ND	ND	0,039	0,039	ND	ND
5	0,039	0,039	0,039	0,039	ND	ND	0,039	0,039	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	0,156	0,156	ND	ND	0,039	0,039	ND	ND	ND	ND
7	0,156	0,156	0,156	0,156	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	0,156	0,156	0,078	0,078	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	ND	ND	0,078	0,078	ND	ND	ND	ND	0,039	0,039	ND	ND
10	ND	ND	0,078	0,078	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Média	0,0429		0,1092		Não se aplica		0,0117		0,0195		Não se aplica	
Desvio-padrão	0,0622		0,0513				0,0188		0,0275			

FONTE: O Autor (2007).

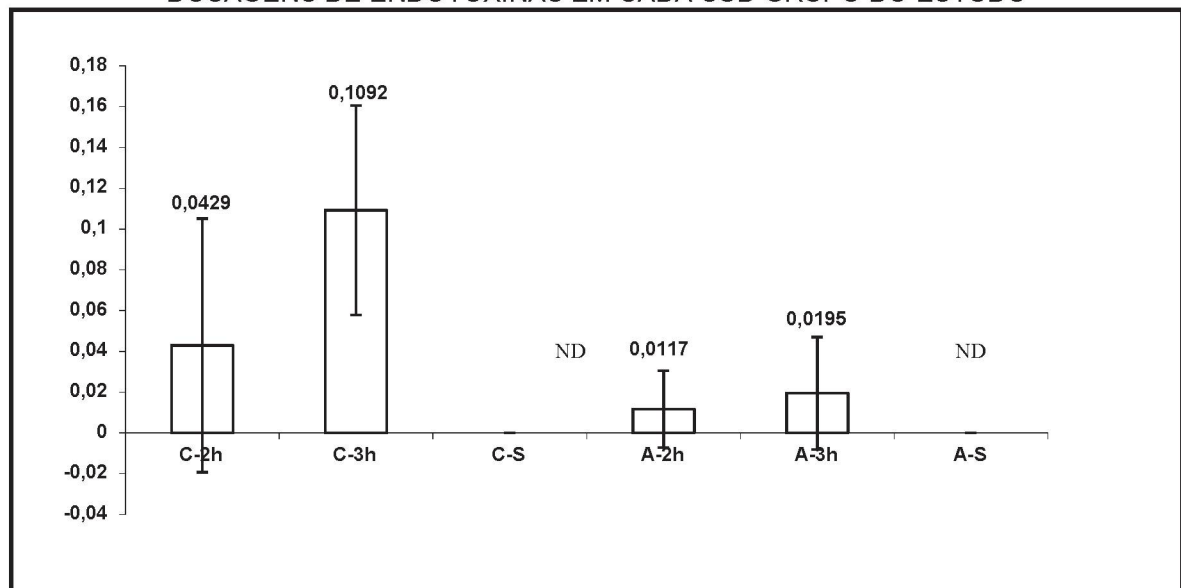
\* ND = não detectável

TABELA 6 – DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÕES DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINAS

Grupos e Subgrupos	Controle			Alopurinol		
	C-2h	C-3h	C-S	A-2h	A-3h	A-S
Média	0,0429	0,1092	Não se aplica	0,0117	0,0195	Não se aplica
Desvio-padrão	0,06	0,05		0,02	0,03	

FONTE: O autor (2007)

GRÁFICO 4 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÕES OBTIDOS NAS DOSAGENS DE ENDOTOXINAS EM CADA SUB-GRUPO DO ESTUDO



FONTE: O Autor (2007).

#### 4.2.2 Comparação entre as médias dos subgrupos

Na avaliação entre as médias das dosagens de endotoxina dos subgrupos, quando foram realizadas comparações entre os subgrupos C-S x A-S, entre C-S x C-

2h, entre A-S x A-2h, entre A-S x A-3h, entre A-2h e A-3h e entre C-2h x A-2h não foi encontrado diferença com significância estatística ( $p > 0,05$ ), porém quando comparação fora entre C-S x C-3h, entre C-2h x C-3h e entre C-3h x A-3h houve diferença estatística ( $p < 0,001$ ) conforme demonstrado na Tabela 7.

TABELA 7 – AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA PELO MÉTODO DE ANOVA NAS DOSAGENS DE ENDOTOXINA EM AMOSTRAS DE SANGUE DE RATOS NOS SUB-GRUPOS DO ESTUDO

Comparações	Grupo		Grupo	p
Entre os simulação de cada grupo	C-S	X	A-S	>0,05
		X	C-2h	>0,05
Entre cada simulação de cada grupo e os subgrupos isquemia	C-S	X	C-3h	<0,001
		X	A-2h	>0,05
	A-S	X	A-3h	>0,05
		X	C-3h	<0,001
Entre os subgrupo isquemia	A-2h	X	A-3h	>0,05
	C-2h	X	A-2h	>0,05
	C-3h	X	A-3h	<0,001

FONTE: O Autor (2007)

### 4.3 AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA

#### 4.3.1 Validação dos resultados na pesquisa de bactérias indicadoras de translocação

Os resultados obtidos na pesquisa de bactérias indicadoras de translocação bacteriana foram expressos pelo número de isolamentos obtidos em cada teste. Estes resultados foram obtidos em triplicata para que fossem validados. As médias dos resultados obtidos no grupo Controle foram, no subgrupo C-S de  $0,1 \pm 0,32$ , no subgrupo C-2h de  $0,8 \pm 0,42$  e no subgrupo C-3h de  $3 \pm 0,67$ .

No grupo Aluporinol as médias dos subgrupos A-S, A-2h e A-3h foram respectivamente  $0,1 \pm 0,32$ ,  $0,7 \pm 0,48$  e  $2,4 \pm 0,97$ . A Tabela 8 apresenta o demonstrativo da validação destes resultados obtidos em triplicatas nas pesquisas de bactérias indicadoras de translocação bacteriana indicada pelo número de órgãos onde houve isolamento.



TABELA 8 – DEMONSTRATIVO DA VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS EM TRIPPLICATAS NAS PESQUISAS DE BACTÉRIAS INDICADORAS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA INDICADA PELO NÚMERO DE ISOLAMENTOS OBTIDOS EM CADA TESTE

Ratos	Controles									Alopurinol								
	C-2h			C-3h			C-S			A-2h			A-3h			A-S		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	1
2	1	1	1	4	4	4	0	0	0	1	1	1	3	3	3	0	0	0
3	1	1	1	4	4	4	0	0	0	1	1	1	2	2	2	0	0	0
4	1	1	1	3	3	3	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
5	0	0	0	3	3	3	0	0	0	0	0	0	2	2	2	0	0	0
6	1	1	1	3	3	3	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
7	0	0	0	3	3	3	0	0	0	0	0	0	4	4	4	0	0	0
8	1	1	1	3	3	3	0	0	0	1	1	1	3	3	3	0	0	0
9	1	1	1	3	3	3	0	0	0	1	1	1	3	3	3	0	0	0
10	1	1	1	2	2	2	0	0	0	1	1	1	2	2	2	0	0	0
Média	0,8			3			0,1			0,7			2,4			0,1		
Desvio-padrão	0,42			0,67			0,32			0,48			0,97			0,32		

FONTE: O Autor (2007).

#### 4.3.2 Ocorrência de isolamento de *E. coli* e *E. faecalis*

Com relação aos índices de ocorrência de *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*, estes foram expressos em resultados positivos ou negativos, neste experimento foram observadas a presença ou ausência destas duas bactérias concomitantemente, logo não houve diferença estatística quando comparadas as incidências de *E. coli* com *E. faecalis* em todos os órgãos estudados, conforme mostra a Tabela 9. Em todas as amostras de intestino houve crescimento destas bactérias, o que confirma a colonização da luz intestinal de todos os animais deste experimento.

TABELA 9 – TAXA DE OCORRÊNCIA DE ISOLAMENTOS DE *Escherichia coli* E *Enterococcus faecalis* EM ÓRGÃOS DE RATOS CONFORME OS GRUPOS DE ESTUDO

Órgão testado	Microorganismos pesquisados	Índice de ocorrência <sup>a</sup>						p
		C-2h	C-3h	C-S	A-2h	A-3h	A-S	
LNM	<i>Escherichia coli</i>	8/10	10/10	1/10	3/10	10/10	1/10	>0,05
	<i>Enterococcus faecalis</i>	8/10	10/10	1/10	3/10	10/10	1/10	
Fígado	<i>Escherichia coli</i>	0/10	9/10	0/10	0/10	3/10	0/10	>0,05
	<i>Enterococcus faecalis</i>	0/10	9/10	0/10	0/10	3/10	0/10	
Baço	<i>Escherichia coli</i>	0/10	2/10	0/10	0/10	5/10	0/10	>0,05
	<i>Enterococcus faecalis</i>	0/10	2/10	0/10	0/10	5/10	0/10	
Sangue	<i>Escherichia coli</i>	0/10	2/10	0/10	0/10	1/10	0/10	>0,05
	<i>Enterococcus faecalis</i>	0/10	2/10	0/10	0/10	1/10	0/10	
Intestinos <sup>b</sup>	<i>Escherichia coli</i>	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	>0,05
	<i>Enterococcus faecalis</i>	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	

FONTE: O Autor (2007)

<sup>a</sup> Índice de ocorrência expressado em resultados positivos / amostras testados.

<sup>b</sup> As amostras de intestinos serviram de controle da pré-existência das bactérias indicadoras na flora intestinal dos ratos

#### 4.3.3 Incidência de translocação bacteriana (TB) nos órgãos estudados

A incidência de TB nos linfonodos dos subgrupos C-2h, C-3h, C-S, A-2h e A-3h, A-S foram respectivamente de 8, 10, 1, 3, 10 e 1, no fígado houve nove animais com translocações no subgrupo C-3h e 3 translocações no subgrupo A-3h, no baço foram observadas duas translocações no subgrupo C-3h e cinco translocações no subgrupo A-3h e no sangue duas translocações no subgrupo C-3h e uma translocação no subgrupo A-3h, nos demais subgrupos não houve translocações.

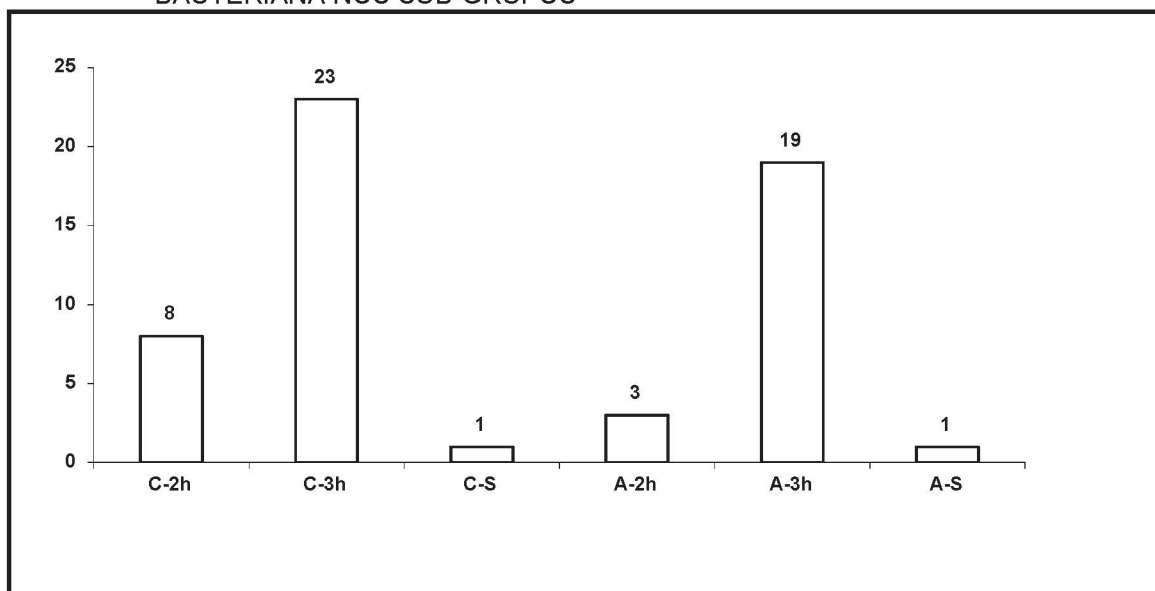
Nas somatórias das translocações por subgrupo computou-se para o subgrupo C-2h 8 translocações, no subgrupo C-3h vinte e três translocações, no subgrupo C-S 1 translocação, no subgrupo A-2h três translocações, no subgrupo A-3h dezenove translocações e no subgrupo A-S uma translocação. Estes achados estão demonstrados na Tabela 10 e no Gráfico 5.

TABELA 10 – INCIDÊNCIA DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA NOS ÓRGÃOS ESTUDADOS CONFORME SUB-GRUPOS DO ESTUDO

Órgãos	C-2h	C-3h	C-S	A-2h	A-3h	A-S
LNM	8	10	1	3	10	1
Fígado	0	9	0	0	3	0
Baço	0	2	0	0	5	0
Sangue	0	2	0	0	1	0
Somatório	8	23	1	3	19	1

FONTE: O Autor (2007)

GRÁFICO 5 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS INCIDÊNCIAS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA NOS SUB-GRUPOS



FONTE: O Autor (2007).

#### 4.3.4 Comparações das somatórias das translocações bacterianas (TB) dos órgãos estudados

Nas comparações das somatórias das translocações bacterianas foram observadas diferenças estatísticas ( $p < 0,001$ ) entre C-S x C-3h, entre A-S x A-3h, entre C-2h x C-3h e entre A-2h x A-3h, porém não foram encontradas diferenças ( $p > 0,05$ ) entre C-S x A-S, entre C-S x C-2h, entre A-S x A-2h, entre C-2h x A-2h e entre C-3h x A-3h, conforme demonstrado na Tabela 11.

TABELA 11 – AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA PELO MÉTODO DE ANOVA NAS SOMATÓRIAS DAS TAXAS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA DAS AMOSTRAS DE ÓRGÃOS DE RATOS NOS SUB-GRUPOS DO ESTUDO

Comparações	Grupo		Grupo	p	
Entre os simulação de cada grupo	C-S	X	A-S	>0,05	
Entre cada simulação de cada grupo e os subgrupos isquemia	C-S	X	C-2h	>0,05	
		X	C-3h	<0,001	
	A-S	X	A-2h	>0,05	
		X	A-3h	<0,001	
	Entre os subgrupo isquemia	C-2h	X	C-3h	<0,001
		A-2h	X	A-3h	<0,001
	C-2h	X	A-2h	>0,05	
	C-3h	X	A-3h	>0,05	

FONTE: O Autor (2007).

#### 4.4 DOSAGENS DE FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA

##### 4.4.1 Validação dos resultados

Os resultados das dosagens de TNF $\alpha$  foram obtidos em triplicata para que estes dados fossem validados. Na avaliação estatística deste achados não houve diferenças significantes entre as médias das amostras dentro dos subgrupos ( $p > 0,05$ ), conforme demonstrado nas Tabelas 12 e 13.

TABELA 12 – DEMONSTRATIVO DA VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS EM TRIPLICATAS NAS DOSAGENS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM AMOSTRAS DO GRUPO CONTROLE

Ratos	C-2h			C-3h			C-S		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	153	163	174	650	648	636	33	32	34
2	216	226	219	716	723	715	36	37	35
3	387	374	381	733	748	698	48	45	43
4	475	482	482	830	841	795	25	28	31
5	376	378	366	623	633	626	43	41	42
6	418	422	414	725	719	715	38	36	33
7	416	418	422	901	816	809	32	29	32

Continua



Continuação

C-2h	C-2h			C-2h			C-3h		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
8	435	422	419	775	762	754	41	39	42
9	221	232	229	682	683	656	43	44	46
10	374	361	359	986	979	912	34	33	34
p	0,9154			0,7851			0,9357		
Média	347,4	348,1	346,7	692,9	686,7	665,4	34,0	33,3	34,1
Desvio-padrão	109,5	104,4	103,0	253,7	247,2	235,2	12,7	11,8	11,5

FONTE: O AUTOR (2007)

TABELA 13 – DEMONSTRATIVO DA VALIDAÇÃO DOS RESULTADOS OBTIDOS EM TRIPLICATAS NAS DOSAGENS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM AMOSTRAS DO GRUPO ALOPURINOL

Ratos	A-2h			A-3h			A-S		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	36	36	37	175	178	184	28	23	27
2	47	49	52	213	226	237	36	39	36
3	28	29	33	247	264	276	23	28	29
4	12	15	15	362	351	358	31	34	32
5	43	44	44	153	163	174	20	22	26
6	38	39	37	361	370	296	38	37	35
7	35	36	34	478	489	445	32	33	34
8	27	28	31	334	344	347	44	43	44
9	28	29	32	207	214	286	41	39	41
10	35	37	36	226	231	231	39	38	37
p	0,8762			0,9797			0,9592		
Média	32,9	34,2	35,1	275,6	283	283,4	33,2	33,6	34,1
Desvio-padrão	9,8	9,5	9,5	103,4	102,7	83,5	7,8	7,1	5,8

FONTE: O Autor (2007)

Os resultados das médias da dosagens de TNF $\alpha$  obtidos nos subgrupos do grupo Controle e dos subgrupos do grupo Alopurinol, bem como seus respectivos desvios-padrão estão descritos nas Tabelas 14 e 15 e representados no Gráfico 6,

TABELA 14 – DEMONSTRATIVO DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÕES DAS DOSAGENS DE TNF ALFA NOS SUB-GRUPOS

Grupos e Subgrupos	Controle			Alopurinol		
	C-2h	C-3h	C-S	A-2h	A-3h	A-S
Média	347,1	749,6	37,0	34,1	280,7	33,6
Desvio-padrão	101,9	99,6	5,8	9,3	93,6	6,7

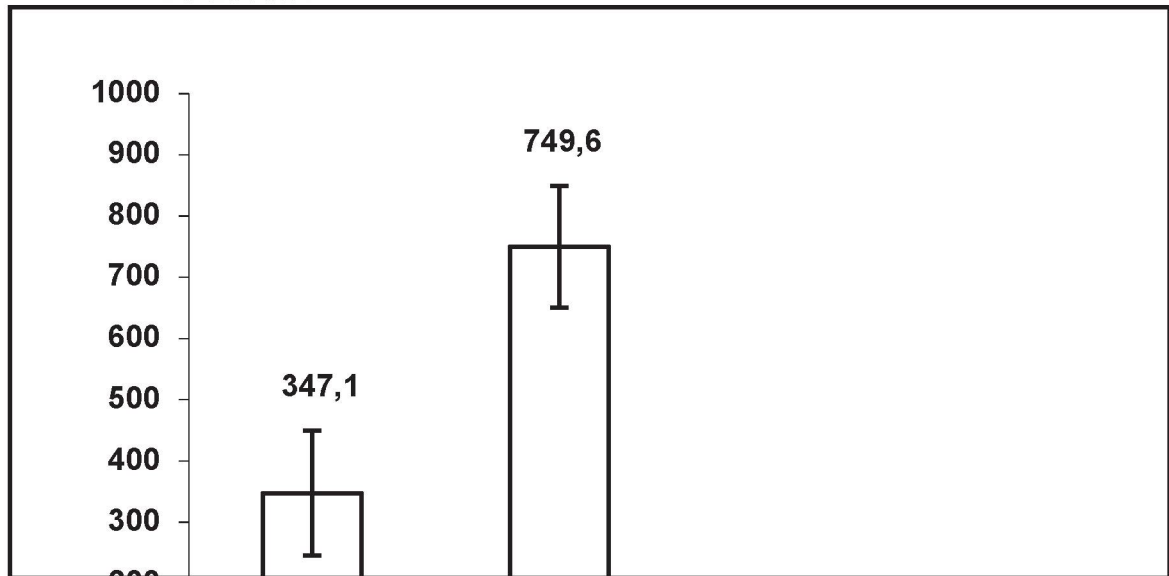
FONTE: O Autor (2007)

TABELA 15 – DEMONSTRATIVO DAS COMPARAÇÕES ENTRE AS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÕES DAS DOSAGENS DE TNF ALFA NOS SUB-GRUPOS

Comparações	Grupo	Grupo	p	Conclusão	
Entre os simulação de cada grupo	C-S	X	A-S	>0,05	NS
	C-S	X	C-2h	<0,001	S
Entre cada simulação de cada grupo e os subgrupos isquemia	C-S	X	C-3h	<0,001	S
	A-S	X	A-2h	>0,05	NS
	A-S	X	A-3h	<0,001	S
	C-2h	X	C-3h	<0,001	S
Entre os subgrupo isquemia	A-2h	X	A-3h	<0,001	S
	C-2h	X	A-2h	<0,001	S
	C-3h	X	A-3h	<0,001	S

FONTE: O Autor (2007)

GRÁFICO 6 – REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DAS MÉDIAS E DESVIOS-PADRÕES OBTIDOS NAS DOSAGENS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM CADA SUB-GRUPO DO ESTUDO



FONTE: O Autor (2007)

## 5 DISCUSSÃO

A isquemia tem papel fundamental em muitas situações clínicas perioperatórias. Apesar da revascularização sanguínea a um órgão isquêmico seja essencial para prevenir a irreversibilidade da lesão celular, a reperfusão pode agravar as lesões produzidas na fase isquêmica isolada (SILVA e BURIHAN, 1999).

Os membros inferiores são frequentemente submetidos à isquemia tecidual devido ao trauma vascular, às oclusões arteriais agudas e aos procedimentos cirúrgicos vasculares habituais e endovasculares. Diante de um quadro isquêmico dos membros inferiores a prioridade é restabelecer o fluxo arterial. A extensão e a gravidade das lesões morfológicas e funcionais dependem exclusivamente do tempo de oclusão do fluxo sanguíneo arterial (SILVA et al., 1999; POLI FIGUEIREDO; CRUZ e MORSCH, 2005).

Trabalhos em animais de experimentação têm procurado estabelecer modelos que possam reproduzir as condições isquêmicas encontradas em seres humanos e com isso ter um melhor entendimento da fisiopatologia da doença e das alternativas terapêuticas (BITU-MORENO; GREGÓRIO; MAFFEI, 2001; SILVEIRA, 2004; BLAISDELL, 2002).

O rato é um animal de uso corrente em modelos de isquemia e reperfusão, inclusive nos membros caudais. É frequentemente utilizado em modelos experimentais, tendo em vista a sua disponibilidade, em quantidades que podem se adequar às necessidades estatísticas, manuseio e custo baixo. A facilidade de manutenção em ambiente controlado propiciou a elaboração de uma amostra homogênea de ratos, com peso de  $256,3 \pm 8,48$  gramas e idades similares (HEBEL e STROMBERG, 1976; FAGUNDES e TAHA, 2004).

Há modelos de isquemia de músculos esquelético que utiliza incisão circunferencial da pele, tela subcutânea e musculatura da coxa, ao redor da articulação do quadril, preservando o osso, o nervo, a artéria e a veia femoral. Justifica-se este modelo para excluir toda a circulação colateral, porém é mais traumático e necessita implementação com microscópio cirúrgico para a sua execução (KERRIGAN e STOTLAND, 1993; WEBSTER, 2004).

Outro modelo já descrito é o uso de torniquete que compromete a irrigação arterial e a drenagem venosa simultaneamente, alguns trabalhos foram realizados, utilizando o método do torniquete de Rosenthal (1943). Argumenta-se que este



modelo de lesão arterial, pelo trauma da aplicação do torniquete, impede a resposta vasomotora e venosa durante a fase de reperfusão. Contudo parece ser adequado para simular um trauma compressivo, ou o procedimento de garroteamento utilizado nas cirurgias ortopédicas (BLAISDELL, 2002, BADHWAR et al., 2003; VIDIGAL, 2006).

Outros modelos preconizam o clampeamento arterial isolado, sendo o mais apropriado para simular a oclusão arterial aguda, uma vez que compromete a circulação arterial deixando livre a drenagem venosa. Este modelo considera que a circulação colateral ficaria disponível para suprir o território isquêmico, o que também ocorre no quadro de oclusão arterial aguda (FRANSCISCO NETO, 2005; DA SILVA, 2004; QUIÑONES-BALDRICH, 1991; SOUZA-MORAES et al., 2003).

Quando ocorre isquemia aguda em um tecido, o suprimento sanguíneo arterial é totalmente bloqueado. Este fato acontece em cirurgias arteriais, transplantes de órgãos e até em cirurgias ortopédicas, onde é feito garroteamento temporário com o intuito de obter campo operatório exangue.

A mortalidade relacionada às cirurgias vasculares de grande porte ainda é problema que preocupa os cirurgiões vasculares em todo o mundo, as cirurgias de embolectomias em artérias periféricas também podem ter evolução não favorável; a mortalidade relacionada com este tipo de cirurgia pode chegar a mais de 10% (YASSIN et al., 1996) e a cirurgia de correção de aneurisma de aorta abdominal cursa com mortalidade em torno de 1% a 10% nos melhores centros mundiais (OLSEN et al., 1991; ROUMEN et al., 1993; KATZ; STANLEY e ZELENOCK, 1994),

Sendo que, na cirurgia de correção realiza-se o clampeamento da aorta abdominal abaixo das renais conforme proposto no modelo experimental deste estudo. Carter, Bull e Bortolon (1998) utilizaram o clampeamento da aorta abdominal de ratos com o intuito de estudar a histopatologia muscular dos membros caudais após isquemia e reperfusão.

Stahlke em 2001 propôs um modelo experimental de indução de endotoxemia em ratos submetidos à isquemia e reperfusão de membros caudais com clampeamento da aorta infra-renal com acesso por laparotomia, o qual foi utilizado no presente estudo, pois as conclusões foram de que este modelo animal experimental é reproduzível, que a isquemia aguda de membros caudais de ratos, por si só, não induz níveis detectáveis de endotoxemia e que a isquemia seguida de reperfusão de membros caudais, induz níveis detectáveis de endotoxemia.

No presente estudo foi utilizado o modelo avaliado por Stalke, para a realização de isquemia e reperfusão com clampeamento da aorta infra renal e para a indução de endotoxemia

A literatura revela que o músculo suporta bem a isquemia de até 4 horas, apesar das repercussões locais e sistêmicas. Sendo a lesão tempo dependente, neste estudo conforme descrito anteriormente o tempo de clampeamento e consequente isquemia foram 2 e 3 horas seguidos de reperfusão e coleta de amostras 72 horas após, observou-se que após a reperfusão existiram diferenças nos resultados das variáveis estudadas quando se considerou o tempo de isquemia.

Foram estabelecidas 2 e 3 horas de isquemia seguidas de reperfusão, neste estudo, porque se verificou na literatura que estes períodos seriam os tempos usados habitualmente em clampeamento aórtico para procedimentos cirúrgicos. Corson et al.(1992) e Yassin et al.(1998) obtiveram resultados semelhantes, utilizando o método do torniquete nos membros caudais dos animais, com 3 horas de isquemia seguidas de 2 horas de reperfusão.

Strock e Majno (1969) verificaram que as primeiras lesões irreversíveis no tecido muscular com o uso do torniquete em membros de ratos se iniciavam em 30 minutos e atingiam o máximo em 60 minutos. Os mesmos autores também verificaram que a heparinização sistêmica dos animais não alterava o fenômeno do “não refluxo”, que é o fato de algumas áreas teciduais não reperfundirem de imediato após a liberação dos torniquetes.

No período de reperfusão os desencadeadores das reações danosas são as espécies reativas do oxigênio, que agravam o quadro das lesões celulares iniciadas na isquemia dos tecidos. O oxigênio é elemento essencial na reação de oxidação para a produção de energia no organismo, armazenada na forma de adenosina trifosfato (ATP). Estas reações de oxidação se dão partir de substratos oxidáveis, em especial a glicose, são realizadas em sua maior parte nas mitocôndrias e dependem de uma interrelação de substratos, enzimas, vitaminas, eletrólitos e água (FRANCISCO NETO; SILVA e FAGUNDES, 2005, MASSBERG e MESSNER, 1998; LAWLER; SONG e DEMAREE, 2003).

Sabe-se que as consequências da isquemia, em diferentes tecidos, depende de sua duração, e que muitas das lesões são desenvolvidas durante o estágio de reoxigenação decorrente da reperfusão tecidual (AALTO e RAIVIO, 1993; ZHANG; DAWSON e DALSON, 1994; SZABO; ZINGARELLI e SALZMAN, 1996). As

mitocôndrias são alvos importantes dos danos provocados pelos processos de isquemia e reperfusão (FARBER, 1981). Nelas ocorrem diminuição das atividades da nicotinamida adenina dinucleotídeo ligada com hidrogênio (NADPH) desidrogenase, do carreador de adenosina difosfato para adenosina trifosfato e da ATP sintetase, além do aumento na atividade da fosfolipase A2. Ocorre ainda, acentuado acúmulo de cálcio e aumento da geração de radicais livres pelas mitocôndrias. A associação destes eventos pode ser responsável pelas lesões e morte celular, decorrentes da reperfusão, possivelmente por um fenômeno de transição de permeabilidade da membrana mitocondrial interna (KONO; OSAWA e TANAKA, 1982).

A xantina-desidrogenase (XD), é uma das enzimas responsáveis pelo mecanismo e fornecimento de um elétron para a nicotinamida adenina difosfato ADP, que sendo receptora deste elétron se transforma em ATP, armazenando a energia de modo estável e transportável dentro da própria célula ou para outros tecidos e órgãos. A supressão do oxigênio determina a conversão de xantina-desidrogenase em xantina-oxidase (XO) (McCORD, 1985).

Esta enzima utiliza o oxigênio como receptor de elétrons, uma ligação instável e altamente energética formando os radicais livres de oxigênio (RLO) ou as espécies reativas do oxigênio (EROs) como os superóxidos e peróxido de hidrogênio (POLI FIGUEIREDO; CRUZ e MORSCH, 2005; SILVEIRA, 2004; BITU-MORENO; FRANCISCHETTI e HAFNER; 2002; McCORD 1985; LAWLER; SONG e DEMAREE, 2003; LI, 2002). Os radicais livres determinam a destruição da camada lipoprotéica das membranas celulares dos núcleos, das mitocôndrias e do citosol levando à morte celular ou desencadeando reações bioquímicas que após determinado tempo levará a morte celular por apoptose (FRANCISCO NETO; SILVA; FAGUNDES, 2006; POLI FIGUEIREDO; CRUZ; MORSCH, 2005; SOUZA; PICCINATO; CHERRI, 2001; DAVID FILHO *et al.*, 2004; PICCINATTO *et al.*, 2004; ALVES, 2003).

Youn et al. em 1993 utilizou para mensuração da lipoperoxidação no pulmão e no fígado a dosagem de malondialdeído pela técnica de TBARS, e demonstrou que a pentoxifilina não reduz a lipoperoxidação na endotoxemia induzida por este processo.

No presente estudo optou-se pela dosagem de TBARS como indicação de estresse oxidativo sendo que diversas técnicas são utilizadas para medir a



peroxidação de lipídeos ou de ácidos graxos como a reação com o ácido tiobarbitúrico, glutationa, determinação da perda de ácidos graxos, dienos conjugados, ensaio idiométrico, análise fluorescente de produtos da peroxidação lipídica e outros. Estas técnicas quantificam diferentes produtos formados em momentos distintos da peroxidação lipídica, como por exemplo dienos conjugados e dialdeído malônico: a sensibilidade e especificidade da técnica depende do tipo do produto a ser quantificado (HALLWEL, 1989; SLATER, 1984).

O teste com ácido tiobarbitúrico (TBA) foi introduzido por Kohn e Liversedge em 1944 e ainda é um dos métodos mais utilizados para medida da peroxidação lipídica (CHIRICO, 1994). Esta técnica tem por objetivo quantificar o dialdeído malônico ("MDA") formado na peroxidação lipídica, que é capaz de reagir, sob aquecimento em meio ácido, com o ácido tiobarbitúrico ("TBA") originando um composto de cor de rosa. Este composto quando extraído da solução por um solvente orgânico (n-butanol) terá sua concentração determinada e expressa como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (SRTBA). Esta técnica é de fácil execução, baixo custo e pode ser empregada para determinação das SRTBA em diferentes materiais biológicos, especialmente em tecidos (UCHIAYAMA e MIHARA, 1978).

Como produtos da isquemia e reperfusão induzidas neste estudo foi observada a eclosão de radicais livres conforme valores mensurados nos subgrupos C2 e C3 com dosagem de TBARS de 0,720, 0,836 nano mol por miligrama de proteína respectivamente e no grupo controle 0,377 nano mol por miligrama de proteína. Sendo estes valores diferentes estatisticamente entre si, foi confirmada a hipótese de que quanto maior o tempo de isquemia maior será a produção de radicais livres decorrentes da lipoperoxidação até 72 horas da reperfusão

Outros estudos também utilizaram a mensuração do malondialdeído pelo método de dosagem de TBARS. Conskun et al., em 2005 utilizaram este método para comprovar que a endotoxemia pode induzir danos ao tecido renal e ainda provou que substâncias antioxidantes como a vitamina E podem minimizar o estresse oxidativo naquele órgão.

Assimakopoulos et al. em 2004 também mensuraram o estresse oxidativo hepático com a dosagem de malondialdeído pela técnica de TBARS, Sauebin et al. (2004) em seu estudo sobre a ação antioxidantes das antocininas em modelo de choque endotoxico utilizaram a mensuração de malondialdeído para demonstrar o

estresse oxidativos nos órgãos estudados. Dirlik *et al.*, (2003) também utilizou o malondialdeído como mensuração de lipoperoxidação em seu modelo de endotoxemia induzida em ratos. E ainda, Ponukalina *et al.* em 2001, Garcia Soriano *et al.* em 2001; Trittenwein *et al.* em 1999, também utilizaram este mesmo método em outros modelos experimentais de isquemia e reperfusão.

Tem-se buscado formas de abolir ou minimizar os efeitos destas espécies reativas de oxigênio ou radicais livres. Para isto tem-se usado substâncias conhecidas como antioxidantes a saber: vitamina E; ácido ascórbico; a deferoxamina; a estreptoquinase; o alopurinol; os sais de magnésio; os aminoesteróides; os quelantes de ferro e os antiinflamatórios não esteroides; substâncias varredoras de radicais livres “*scavengers*”.

Também se utiliza o pré-condicionamento isquêmico, quando suspensões parciais e progressivas de oxigênio antecedem uma supressão sustentada e mais prolongada. Cada uma destas proposições têm mostrado vantagens e desvantagens na dependência do modelo para a provocação da isquemia e reperfusão, nas doses das substância utilizadas, no período em que são empregados, nos parâmetros que são utilizados para a avaliação dos resultados, entre outras variáveis.

A busca por uma droga que reduza a liberação de espécies reativas do oxigênio, bem como limitar a resposta inflamatória e a liberação de fator de necrose tumoral ( TNF $\alpha$ ) constitui uma hipótese para o controle das lesões de isquemia e reperfusão.

A xantina oxidase catalisa a oxidação da hipoxantina em xantina e desta em ácido úrico. O oxigênio é simultaneamente reduzido a O<sub>2</sub><sup>-</sup> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. É possível verificar aumento de xantina oxidase quando o tecido é submetido a alguns tipos de agressões, tais como trauma ou hipóxia (GRAGER, 1988).

Evidências acumuladas em diversos experimentos têm demonstrado que EAO contribuem para o dano celular decorrente da isquemia e reperfusão, principalmente, em função da propriedade oxidativa das mesmas sobre os constituintes lipídicos das membranas celulares. O alopurinol tem sido sugerido como droga capaz de interferir benéficamente diminuindo o dano celular decorrente da reperfusão de órgãos previamente isquêmicos, tendo em vista o seu potencial de inibir a enzima xantina oxidase, a mais frequentemente referida como geradora de EAO.

Rodhen em 1998 na avaliação da lipoperoxidação utilizou-se os métodos do TBARS e da Quimiluminescência (QL) sendo os animais divididos em 4 grupos, da seguinte maneira: ratos controle, ratos submetidos a isquemia de 50 minutos, ratos submetidos a isquemia de 50 minutos e reperfusão de 1 hora e ratos submetidos a isquemia de 50 minutos e reperfusão de 1 hora porém com pré-tratamento com alopurinol na dose de 50 mg/kg de peso administradas por via intraperitoneal, 5 e 1 hora antes do procedimento e concluíram que o alopurinol mostrou efeitos benéficos no dano causado pela isquemia e reperfusão renal, provavelmente decorrente de sua ação na rota de geração das EAO.

No presente estudo fora utilizado o alopurinol para interferir nos danos causados pela isquemia e reperfusão na dose de 100mg/kg de peso administrada por gavagem e nos subgrupos tratados com alopurinol, observou-se diminuição da produção de radicais livres decorrentes de lipoperoxidação pois os valores de TBARS encontrados nos subgrupos A-S, A-2 e A-3 que foram respectivamente,  $0,373 \pm 0,038$ ,  $0,391 \pm 0,045$  e  $0,378 \pm 0,045$ , sendo que estes resultados não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados entre si.

E ainda houve menor produção de lipoperoxidação nos subgrupos tratados com alopurinol em relação aos subgrupos não tratados, e mais, o tratamento com alopurinol propiciou que as quantidades de TBARS nas amostras dos grupos tratados fossem iguais as dos subgrupos simulação, onde não houve isquemia e reperfusão, mostrando que o alopurinol inibiu a lipoperoxidação.

Com estes achados ficou claro que houve uma redução significativa na detecção de TBARS nos subgrupos que foram submetidos á isquemia e reperfusão quando tratados com alopurinol e que ainda o tempo de isquemia nos não tratados também gerou diferentes quantidades de TBARS sendo que quanto maior o tempo de isquemia maior a geração de TBARS, o que concorda com a literatura.

A natureza autocatalítica das reações dos radicais livres é o fator mais importante na deterioração oxidativa de substratos orgânicos. Durante o estágio de propagação um radical livre pode produzir *ad infinitum*, quando somente a concentração do oxigênio e de substrato estabelece os limites da reação (BONORDEM e PARIZA, 1994).

Yang et al. em 1997 demonstraram que a reperfusão tecidual após isquêmica causada por choque, pode induzir a produção de radicais livres de oxigênio, resultando lesão por lipoperoxidação, especialmente na mucosa intestinal



e assim induzir a ruptura da barreira funcional da mucosa seguindo então a endotoxemia e a translocação bacteriana

Os dados obtidos nos estudos de Corson et al. 1992 e Yassin et al. (1996) demonstram que a isquemia seguida de reperfusão, promove o aparecimento de endotoxinas detectáveis na corrente circulatória. O exato mecanismo como esta ocorrência afeta a permeabilidade intestinal ainda não está totalmente entendido. Porém sabe-se que a reperfusão de órgãos isquêmicos têm efeitos sistêmicos danosos porque retiram os metabólitos formados localmente nos tecidos e esses irão agir sistematicamente até serem metabolizados.

A barreira intestinal é a denominação que se dá aos mecanismos imunológicos e não imunológicos que evitam o escape de bactérias e suas toxinas do conteúdo intraluminal para outros órgãos, como os linfonodos fígados e também para a circulação sistêmica; no entanto permite que o intestino execute, fisiologicamente, as suas diversas funções de digestão, absorção de nutrientes e secreção (SWANK e DEITCH, 1996; WELLS; MADDAUS e SIMMONS, 1988).

Alterações desta barreira de defesa podem permitir a passagem de bactérias viáveis e de suas toxinas da luz intestinal para a circulação sistêmica tornando-se um dos pilares de sustentação para o desenvolvimento de septicemia e falência de múltiplos órgãos e sistemas (DEITCH, 1987 e 1989).

A presença desta barreira intestinal íntegra é a maior responsável pelo bloqueio da passagem de bactérias viáveis da luz intestinal para outros órgãos e para a circulação sistêmica (SAADIA et al., 1990).

Grande parte dos óbitos em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos são devidos a complicações que não estão relacionadas diretamente com a técnica cirúrgica. As principais causas de óbito nesses pacientes, no período de pós-operatório imediato, são: disfunções respiratórias, renais, falências hepáticas e até o cenário sombrio da Síndrome da Falência de Múltiplos Órgãos (ERTEL; FRIEDL; e TRENTZ, 1994; HARRIS et al. 1991; OLSEN et al. 1991). Esta síndrome é encontrada em 20% de todos os pacientes que morrem após cirurgias cardiovasculares (YASSIN et al. 1996).

Quando se instala a síndrome da falência de múltiplos órgãos, em 24% dos pacientes não há evidência de infecção (MENGER et al. 1992). Infecção bacteriana ou sepse são detectadas em grande parte dos pacientes, com a síndrome instalada, após dois ou mais dias. No presente estudo a coleta das amostras eram com 72

horas, este período de avaliação foi motivo de vários estudos que consideraram o intestino como a fonte de endotoxinas e bactérias para a corrente circulatória (ALEXANDER et al. 1990; ALEXANDER et al. 1991; CARRICO; MEAKINS; MARSHALL et al.1993; CARRICO; MEAKINS e MARSHALL, 1986; CARTER et al.1990; DEITCH et al.1990; DEITCH et al. 1989b; ERTEL; FRIEDL e TRENTZ, 1994; GORIS; BOEKHOLTZ; van BEBBER, 1986; NAVARATNAM et al. 1990; RUSH et al.1988; SAADIA, 1995; SWANK e DEITCH, 1996; Van GOOR et al. 1994; MOORE MOORE, 1995).

Stalke em 2001 verificou que em determinadas condições, a isquemia e reperfusão de órgãos distantes ao trato digestório, podem levar à quebra da seletividade da barreira intestinal, fato este comprovado pela detecção de endotoxinas na corrente circulatória de ratos. Sabe-se que a permeabilidade intestinal às macromoléculas é alterada na isquemia seguida de reperfusão de membros de ratos e camundongos (CORSON *et al.*, 1992; YASSIN *et al.*, 1997; GRANGER, 1988).

Corson et al. (1992) verificaram que a permeabilidade intestinal às endotoxinas é alterada após a aplicação e soltura dos torniquetes nos membros dos animais, em seus estudo as concentrações sistêmicas de endotoxinas elevaram-se em relação ao grupo controle. A permeabilidade intestinal destes animais foi afetada por lesões comprovadas por microscopia eletrônica: alterações na mucosa, encurtamento das microvilosidades e rupturas nas junções intercelulares em todos os animais do grupo isquemia e reperfusão foram detectadas. Estes autores também verificaram que a hipotensão que ocorre no período de reperfusão, por si só, não altera a permeabilidade intestinal.

Yassin et al..(1997) verificaram que a reperfusão de membros caudais de ratos diminuiu a espessura da mucosa do intestino delgado dos animais e aumentou a permeabilidade de todo o intestino.

Welch et al. (1998) estudaram pacientes que foram submetidos à cirurgias eletivas na aorta abdominal, aneurismectomia ou ponte arterial, com colonoscopia e biópsias intestinais. Os resultados mostraram a ocorrência lesão da mucosa intestinal, identificada pela biópsia, em 30% dos pacientes.

Roumen et al. (1993) estudaram a permeabilidade intestinal após isquemia e reperfusão em pacientes submetidos à cirurgias de grande porte. Os autores utilizaram o teste da lactulose e manitol. Este é fundamentado na diferença de vias

de absorção que o intestino utiliza. O manitol tem peso molecular menor em relação à lactulose e por isso é absorvido por poros aquíferos que existem na membrana celular do enterócito. A lactulose, molécula maior, é absorvida através das junções intercelulares e zonas de extrusão dos vilos intestinais.

A excreção de lactulose e manitol foi significativamente maior no grupo que foi submetido a cirurgias eletivas e emergenciais em comparação do grupo controle, que não foi operado. Este estudo demonstrou que, após cirurgias vasculares de grande porte, ocorre elevação da permeabilidade intestinal.

Pape et al. (1994) verificaram que a permeabilidade intestinal pode ser afetada pelas moléculas de xantina-oxidase produzidas durante a reperfusão de órgãos distantes ao intestino.

No presente estudo foram observados nos subgrupos com isquemia e reperfusão níveis detectáveis de endotoxina, nos grupos simulação os níveis de endotoxemia não foram detectados e ainda foram observados que o níveis nos subgrupos C-2 e C-3 foram 0,0429(UE) e 0,1092(UE) respectivamente, nos subgrupos dos ratos tratados com alopurinol, A-2 e A-3 foram 0,0117(UE) e 0,0195(UE) respectivamente, sendo menores quando comparados com os não tratados, mostrando que o bloqueio da xantina-oxidase é um mecanismo inibidor de endotoxemia.

Os radicais livres produzidos durante o período de reperfusão são os principais responsáveis pelas lesões em órgãos distantes daqueles que sofreram a isquemia. O aparelho digestório dos mamíferos possui alta concentração de xantina-oxidase; especialmente essa concentração é maior na mucosa do intestino delgado. Quando ocorre a reperfusão, a produção de radicais livres por estas enzimas nestes locais é muito elevada (ZIMMERMAN; GRANGER e PALLER, 1992). Isto poderia explicar o aumento da permeabilidade intestinal, quando há reperfusão.

Os efeitos da reperfusão e translocação bacteriana podem ser amenizados por algumas drogas; alguns exemplos são: o alopurinol, que é inibidor competitivo da xantina-oxidase e pode reduzir a endotoxemia por reduzir a peroxidação lipídica da mucosa intestinal (ZIMMERMAN; GRANGER e PALLER, 1992; MENGER et al. 1992; GRACE, 1994); a pentoxifilina é uma metilxantina com propriedades de inibir o fator agregador de plaquetas (FAP) e aumentar a síntese de prostaciclina (vasodilatador) (ADAMS et al. 1995); a dexametasona e L-NAME (KNIGHT et al. 1997); a superóxido-dismutase, que é enzima carreadora dos radicais livres



superóxido ( $O_2^-$ ) (YOUNES et al. 1992; MENGER et al. 1992) e outras. Optou-se no presente estudo pelo alopurinol.

Neste estudo foi observado que houve diferença estatística quanto aos níveis de endotoxemia nos grupos com 3 horas de isquemia e reperfusão quando tratados ou não com alopurinol. No grupo tratado com alopurinol o nível de endotoxina fora menor, sugerindo que o alopurinol bloqueia endotoxemia, os níveis nos subgrupos C-2 e C-3 foram 0,0429 UE/ml e 0,1092 UE/ml respectivamente, nos subgrupos dos ratos tratados com alopurinol, A-2 e A-3 foram 0,0117 UE/ml e 0,0195 UE/ml respectivamente.

A barreira intestinal é a denominação que se dá aos mecanismo imunológicos e não imunológicos que evitam o escape de bactérias e suas toxinas do conteúdo intraluminal para outros órgãos, como os linfonodos fígados e também para a circulação sistêmica; no entanto permite que o intestino execute, normalmente, as suas diversas funções de digestão, absorção de nutrientes e secreção (SWAMK et al. 1996; WELLS; MADDAUS; e SIMMONS, 1988). No presente estudo foram feitas culturas para observar translocação bacteriana em linfonodos, fígado, baço e hemoculturas.

Desde que o termo “translocação bacteriana” foi cunhado por Wolohow et.al em 1966, estuda-se o mecanismo exato pelo qual bactérias presentes na luz intestinal, chegam viáveis aos linfonodos mesentéricos e à circulação sistêmica (STEFFEN e BERG, 1983; WELLS; MADDAUS e SIMMONS, 1988).

As bactérias mais comumente associadas a infecções sistêmicas em pacientes graves são as mesmas que translocam com maior facilidade que outras, estas espécies incluem *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, outras enterobactérias, *Enterococcus sp.*, *Streptococcus sp.*, *Lactobacillus sp.* *Cândida albicans* e *Staphylococcus sp.*, estas bactérias seriam transportadas para os linfonodos mesentéricos como patógenos intracelulares facultativos, assim como partículas são transportadas para linfonodos mesentéricos dentro de fagócitos teciduais (WELLS, 1990).

Apesar do maior número de bactérias anaeróbicas em relação às aeróbicas na luz intestinal, os anaeróbios não translocam com a mesma facilidade que as bactérias aeróbicas e conseqüentemente causam menos complicações sépticas (SIMON e GORBACH, 1982; STEFFEN e BERG, 1988).

Diversos estudos experimentais demonstram a translocação bacteriana em situações onde o intestino atua como reservatório de bactérias e fonte de infecções sistêmicas (ALEXANDER, 1990; BORDER; et al. 1987; CARRICO; MEAKINS e MARSHALL, 1986; DEITCH; MORRISON e BERG, 1990; NIEUWENHUIJZEN; DEITCH; GORIS; BOEKHOLTZ e Van BEBBER, 1996; ZENI NETO et al. 1997).

Os principais fatores que aumentam a translocação bacteriana incluem a lesão direta do enterócito como por exemplo, as irradiações, na alteração da microflora intestinal, após o uso de antibióticos, na alteração nutricional e na redução do fluxo sanguíneo intestinal (ALEXANDER, 1990; MARTINS, 1997)

Zeni Neto et al. em 1997 e Martins em 1997 encontraram após isquemia de intestino translocação bacteriana com predominância de *Escherichia coli*, *Enterococcus sp.*, *Proteus sp.*, *Bacterioides fragilis*, *clostridium sp.* No presente estudo foram isolados *E. coli* e *E. faecalis*.

Rush Jr et al. (1988) avaliaram pacientes com trauma severo admitidos com graus variáveis de choque e demonstrou positividade das hemoculturas em 56% dos pacientes com pressão arterial menor que 80mmHg à admissão. Dos pacientes com pressão arterial sistólica maior que 110mmHg, em 4% houve positividade das hemoculturas.

Martins (1997) utilizou a isquemia do cólon descendente com a intenção de avaliar se o tempo desta isquemia teria ou não influência em aumentar o índice de translocação bacteriana, este modelo experimental visou reproduzir uma situação clínica na qual um possível retardo da indicação cirúrgica, em um paciente que apresente isquemia segmentar de cólon, possa permitir um aumento significativo nos índices de translocação bacteriana e as suas conseqüentes repercussões sistêmicas. Os dados demonstraram que o tempo de isquemia teve grande importância em promover aumento dos índices de translocação bacteriana em ratos.

Com o objetivo de verificar a ocorrência de translocação bacteriana e absorção de endotoxinas em vinte e um pacientes doadores de órgãos, GOOR et al., realizaram culturas de linfonodos mesentéricos, sangue fígado, pulmão e baço. Coletas sanguíneas para dosagem de endotoxina também foram realizadas. Em 67% dos doadores houve detecção de bactérias nas culturas. Em 81% destas culturas a bactéria isolada foi um germe entérico, demonstrando a translocação bacteriana, visto que a integridade do trato intestinal foi confirmada pela microscopia ótica e eletrônica.

A dosagem de endotoxina sistêmica estava elevada em 19% dos doadores. Os autores concluíram que a translocação bacteriana e a absorção de endotoxinas é frequente entre paciente doadores de órgãos, o que pode influenciar a função do enxerto nos pacientes transplantados.

No presente estudo foram avaliadas a translocação bacteriana e a presença de endotoxinas para demonstrar que houve lesão da parede intestinal pelo radicais livres resultantes da isquemia e reperfusão. As bactérias presentes neste estudos foram *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis* e em todas as amostras de intestino houve crescimento destas bactérias, o que confirma a colonização da luz intestinal de todos os animais deste experimento.

Há múltiplas vias por onde as bactérias podem translocar do aparelho digestório para sítios sistêmicos: migração retrógrada pulmonar, migração direta através da parede intestinal e migração para linfonodo mesentérico ou fígado através dos canais linfáticos ou vasculares; uma ou mais destas vias podem ocorrer simultaneamente (MARSCHALL et al. 1993). E neste estudo como fora comprovada a lesão do enterócitos por lipoperoxidação na parede intestinal supõe-se tenha sido através da parede intestinal.

A translocação bacteriana neste estudo foi pesquisada nos linfonodos, fígado, baço e no sangue, nas somatórias das translocações ocorridas por subgrupo observou-se para o subgrupo C-2 8 translocações, no subgrupo C-3 23 translocações, no subgrupo C-S 1 translocação, no subgrupo A-2 3 translocações, no subgrupo A-3 19 translocações e no subgrupo A-S 1 translocação.

Nas comparações destas somatórias das translocações bacterianas foram observadas diferenças estatísticas ( $p < 0,001$ ) entre C-S x C-3h, entre A-S x A-3h, entre C-2h x C-3h e entre A-2h x A-3h, porém não foram encontradas diferenças ( $p > 0,05$ ) entre C-S x A-S, entre C-S x C-2h, entre A-S x A-2h, entre C-2h x A-2h e entre C-3h x A-3h.

O aparelho digestório possui em seu interior bactérias e seus metabólitos, as toxinas, que devem ser bloqueadas de forma seletiva concomitantemente à absorção de nutrientes. Para realizar esta função, o intestino mobiliza métodos imunológicos e não imunológicos, com a função de prevenir a passagem de bactérias e endotoxinas para fora da luz intestinal. Esse mecanismo é denominado, genericamente, de barreira intestinal (REYNOLDS, 1996; TRAYA, 1999).



Quando esta barreira é quebrada, é acionada a segunda linha de defesa, formada por este elenco: tecido linfóide intestinal, células Kupffer hepáticas e imunoglobulinas séricas (YASSIN *et al.* 1998). Essas células e tecidos com função imunológica ativam a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8) e outros mediadores imunoinflamatórios. Esses mediadores intestinais podem induzir a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica e esta levar à Síndrome da Falência de Múltiplos Órgãos.

Diversas condições que geram resposta inflamatória severa ou que associe problemas imunológicos com regimes terapêuticos que alterem o balanço ecológico da microflora nativa intestinal, tais como: queimaduras (ALEXANDER *et al.* 1991; CARTER *et al.* 1990; LeVOYER *et al.* 1992; DEITCH *et al.* 1985), traumas mecânicos (BAKER *et al.* 1998; PAPE *et al.* 1994; ROUMEN *et al.* 1993; RUSH JUNIOR *et al.* 1988), infecções (TRAYA, 1999), choque (RUSH JÚNIOR. *et al.* 1988), isquemia intestinal (MARTINS, 1997), uso de vasodilatadores (TRAYA, 1999), quimioterapias (BERG, 1992), desnutrição (ALEXANDER *et al.* 1990), nutrição parenteral total (MOORE e MOORE; JONES, 1989) isquemia e reperfusão (STALKE 2001) e outros, são capazes de levar à falência da barreira intestinal com translocação de bactérias e endotoxinas para fora da luz intestinal.

A saída de endotoxina para fora da luz intestinal, gerando a Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica, podendo levar até a Síndrome da Falência de Múltiplos Órgãos, levou alguns autores a determinar o trato digestório como o causador desta síndrome (BORDER *et al.* 1987). Carrico, Meakins e Marshall, em 1986 definiram o intestino como o “motor” dessa disfunção, porém Swank e Deitch em 1996 concluíram que o sistema imunoinflamatório é o verdadeiro “motor” dessa síndrome, enquanto o intestino é um dos principais “pistões” que impulsionam esse “motor”.

O arsenal existente para combater bactérias é tão poderoso e envolve tantos mecanismos de defesa diferentes que a resposta imunológica sistêmica é até mais perigosa que a própria bactéria (CARRICO, 1993).

No presente estudo adotou-se a dosagem do TNF $\alpha$  para aferir a ativação da cascata inflamatória decorrente da ruptura da barreira promovida pelo estresse oxidativo induzido pela isquemia e reperfusão e fora observado que os valores encontrados nos subgrupos do grupo controle, C-2, C-3 e C-S, foram respectivamente 347,1, 749,6 e 37,0 mostrando que quanto maior o tempo de

isquemia maior fora a resposta inflamatória com maior produção de TNF $\alpha$  e então quando para o mesmo tempo de isquemia e reperfusão os ratos foram tratados com alopurinol observou-se que os valores de TNF $\alpha$  foram nos subgrupos A-2, A-3 e A-S de 34,1, 280,7 e 33,6 ficando demonstrado que estes valores foram menores do que os dos subgrupos não tratados mostrando que o alopurinol diminui a ativação das citocinas na cascata inflamatória. E nestes achados as diferenças foram estatisticamente significativas.

Altavilla et al. em 1998 e em 2002 correlacionaram o estresse oxidativo, mensurado pelo método de TBARS, induzido por endotoxemia com a ativação NF kappa $\beta$  e mensurou TNF $\alpha$ . E conclui em seu estudo que a inibição da ativação do fator nuclear NF kappa $\beta$  reduz os níveis de TNF $\alpha$  e reverte o choque endotóxico

Peralta et al. em 2002 no seu estudo com condicionamento com isquemia observaram que a inibição da xantina-oxidase com alopurinol atenua o dano inflamatório no pulmão após isquemia e reperfusão hepática.

Qling et al. em 2006 utilizou a dosagem de malondialdeído e sua relação com TNF $\alpha$  para estudar os estresse oxidativo no fígado para comparar a solução de Wisconsin com e sem pentoxifilina em transplante hepático.

Lin et al. em 2004 também utilizou a dosagem de malondialdeído, TNF $\alpha$  e interferon para estudar a relação entre o estresse oxidativo e sua ativação na cascata inflamatória em um modelo canino de transplante renal autólogo.

Gu et al. em 2004 demonstraram em seu modelo experimental de isquemia e reperfusão hepática a inibição do NF-kappa $\beta$  e do TNF $\alpha$  com a utilização de alopurinol. Urata et al. em 2000 em seu estudo sobre isquemia e reperfusão em transplante hepático correlacionaram o tempo de isquemia com a ativação das células de kupffer e a produção de TNF $\alpha$  e ainda observou através da inibição de ambos que as células de Kupffer são diretamente responsáveis pela síndrome de choque sistêmico induzido por endotoxina e que estes efeitos são mediados pelo TNF $\alpha$ .

Loftis et al. em 2000 afirmaram que a endotoxina das bactérias gram negativas e a hipóxia celular podem ativar o fator-Kappa $\beta$  via geração de espécies reativas do oxigênio e que a utilização de alopurinol reduz a ativação do fator-Kappa $\beta$  e a produção de TNF $\alpha$ . Outros autores utilizaram a relação entre isquemia e reperfusão induzindo a quebra da barreira intestinal observando a presença de LPS e a ativação do TNF $\alpha$  como Watanabe et al. em 2005 estudando em fígado de

macaco, Langdale et al. em 2003 estudando a sustentação da tolerância ao LPS após dano da isquemia e reperfusão em um fígado previamente exposto à isquemia.

Enfim todos estes estudos aqui citados confirmam a relação entre o estresse oxidativo e a ativação da cascata inflamatória e que ainda, o alopurinol inibindo a xantina-oxidase inibe também a produção de  $\text{TNF}\alpha$ , estando deste estudo em concordância com a literatura, o delineamento e os achados.



## 6 CONCLUSÃO

No modelo proposto neste estudo de isquemia e reperfusão de membros caudais, em animais submetidos à 2 e 3 horas de isquemia demonstrou-se que em relação ao grupo controle ocorreu aumento da lipoperoxidação no intestino, da endotoxemia, da translocação bacteriana e dos níveis séricos de TNF $\alpha$ .

Quando no mesmo modelo os animais são tratados com alopurinol, os achados demonstraram diminuição da lipoperoxidação intestinal, da endotoxemia, da translocação bacteriana e dos níveis séricos de TNF $\alpha$ . Assim sendo, o presente estudo sugere que o alopurinol exerce efeito protetor aos danos causados pela isquemia reperfusão, mas não sua completa inibição.

## REFERÊNCIAS

- AALTO, T. K.; RAIVIO, K. O. Nucleotide depletion due to reactive oxygen metabolites in endothelial cells: effects of antioxidants. **Pediatric. Res.**, Baltimore, v.34, p.572-576, 1993.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. O sistema complemento. **In: Imunologia celular & molecular**. 3. ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2000. p.305-309.
- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. Citocinas. **In: Imunologia celular & molecular**, Rio de Janeiro: Revinter, 2000. p.264-268.
- ABBEY, M. Antioxidant vitamins and low-density-lipoprotein oxidation. **Am. J. Clin. Nutr.**, Bethesda, v.53, p.201S-205S, 1991.
- ABDALLA, D. S. P. Anti-oxidantes: conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. **Ars Cvrandi**, São Paulo, n.6, p.141-164, 1993.
- ADAMS Jr., J.G. et al.. Effect of pentoxifyline on tissue injury and platelet-activating factor production during ischemia-reperfusion injury. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v.21, n.5, p.496-512, 1995.
- AKAMINE, N. et al.. **Choque séptico e mecanismo de agressão tecidual**. 2004. p.22-27.
- ALEXANDER, J. W. et al. The process of microbial translocation. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 212, n.4, p.496-512, Oct. 1990.
- ALEXANDER, J.W. 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, 1991.
- ALEXANDER, J. W. How do complement components and fragments affect cellular phagocytic function? **J. Trauma**, Baltimore, v.24, suppl, p.122, 1984.
- ALTAVILLA, D. et al.. Inhibition of tumour necrosis factor and reversal endotoxin-induced shock by 83836E, a 'second generation' lazardoid in rats. **Br. J. Pharmacol.**, London, v.124, p.1293-1299, 1998.
- ALTAVILLA, D. et al.. Inhibition of nuclear factor-kappa $\beta$  activation by IRFI 042, protects against endotoxin-induced shock. **Cardiovasc. Res.**, London, v.54, n.3, p.684-693, 2002.
- ALVES, W. F. et al.. Repercussões da L-alanil-glutamina sobre as concentrações de lactato e lactato desidrogenase em paciente com isquemia crítica dos membros inferiores submetidos a revascularização distal. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.18, p.209-215, 2003.

AMBROSE, N. S.; JOHNSON, B. D. W. Incidence of pathogenic bacteria from mesenteric lymph nodes and ileal serosa during Crhon's disease surgery. **Br. J. Surg.**, Guildorfd, v.71, p.623-625, 1984.

APITZ, K. A study of the generalized Shwartzman phenomenon. **J. Immunol.**, Baltimore, v.29, p.255, 1935.

ASSIMAKOPOULOS, S. F. et al.. Gut regulatory peptides bombesin and neurotensin reduce hepatic oxidative stress and histological alterations in bile duct legated rats. **Regul. Pept.**, Amsterdam, v.120, n.1/3, p.185-193, 2004.

BADHWAR, A. M. et al.. Limitations of ischemic tolerance in oxidative skeletal muscle: perfusion vs tissue protection. **J. Surg. Res.**, New York, v.109, p.62-67, 2003.

BAKER, J. W. et al.. Hemorrhagic shock induces bacterial translocation from gut. **J. Trauma**, Baltimore, v.28, n.7, p. 896-906, 1998.

BERG, R. D. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **J. Med.**, Westbury, v.23, n.3/4, p.217-244, 1992.

BERG, R. D.; GARLINGTON, A. W. Translocation of certain endogenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model. **Infect. Immun.**, Washington, v.23, p.403-411, 1979.

BEYERSDORF, F. Avoiding reperfusion injury after limb revascularization. Experimental Observations and recommendations for clinical application. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v.9, p.757-766, 1989.

BITU-MORENO, J.; FRANCISCHETTI, I.; HAFNER, L. Lesões de isquemia-reperfusão em músculo esquelético: fisiopatologia e novas tendências de tratamento, com ênfase na reperfusão controlada. **J. Vasc. Bras.**, Rio de Janeiro, v.1, n.2, p.113-120, 2002.

BITU-MORENO, J.; GREGÓRIO, E. A.; MAFFEI, F. H. A. Effect of alpha-tocoferol on ischemia/reperfusion lesions induced in hindlimb of rats. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.16, p.25-31, 2001.

BLAISDELL, F. W. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. **Cardiovasc. Surg.**, London, v.10, n.6, p.620-630, 2002.

BLAISDELL, T. W.; STEELE, M.; ALLEN, R. E. Management of acute lower extremity arterial ischemia due to embolism and thrombosis. **Surgery**, St Louis, v.84, p.822-834, 1978.

BONORDEM, W, R.; PARIZA, M. W. Antioxidant Nutrients and Protection from free Radicals, In: KOTSONIS, F.N.; MACKEY, M.; HJELLE. J. (Ed.). **Nutritional toxicology**. New York: Raven Press, 1994. p.19-48.

BORDER, J. R. et al.. The gut origin sepsis state in blunt multiple trauma (ISS-40) in the ICU. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v.206, p.427-448, 1987.



CARRICO, C. J.; MEAKINS, J. L.; MARSHALL, J.C. The gastrointestinal tract. The "motor" of MOF. **Arch. Surg.**, Chicago, v.121 p.196-208, 1986.

CARRICO, C. J. The elusive pathophysiology of the multiple organ failure syndrome. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v.218, n.2, p.109-110, Aug.1993.

CARTER, E. A. et al.. Cutaneous thermal injury alters macromolecular permeability of rats small intestine. **Surgery**, St Louis, v.107, n.3, p.335-341, 1990.

CARTER, W. O.; BULL, E.; BORTOLON, L. A murine skeletal muscle ischemia-reperfusion injury model: deferential pathology in BALB/c and DBA/2N mice. **J. Appl. Physiol.**, Bethesda, v.85, n.5, p. 1676-1683, 1998.

CASE, R. B. The ischemic myocardium: metabolic, electrolyte and structural abnormalities. In CARVALHO. V. B.; MACRUZ, R. (ed.). **Cardiopatia isquêmica: aspectos de importância clínica**. São Paulo: Sarvier, 1989, p.63-72.

CHANCE, B.; SIES, H.; BOVERS, A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* Bethesda, v.59, p.527-605, 1979.

CHEUNG, J. Y. et al.. Calcium and ischemic injury. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.314, n.26, p.1670-1676, 1983.

CHIEN, K. R. et al.. Prevention by clorpromazine of ischemic liver cell death. **Am. J. Pathol.**, New York, v.88, p.539-557, 1977.

CHIRICO, S. High performance liquid chromatography based thiobarbituric acid test. **Meth. Enzymol.**, New York, v.233, p.314-318, 1994.

COCHRANE, C. G. Mechanisms of oxidant injury of cells. **Mol. Aspects Med.**, Elmsford, v.12, p.137-147, 1991.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, London, v.420, p.885-891, 2002.

COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA). Disponível em: <<http://www.meusite.com.br/COBEA>>. Acesso em: 07/07/2005.

CONCANNON, M. J.; DOOLEY, T. W.; PUCKETT, C. L. Improved survival in a replantation model containing ischemic muscle. **Microsurgery**, New York, v.12, n.1, p.18-22, 1991.

CONSKUM, O. et al.. Protection of endotoxin-induced oxidative renal tissue damage of rats by vitamin E or and E Gb 761 treatment. **J. Appl Toxicol.**, Chichester, v.25, n.1, p.8-12, 2005.

CORSON, R. J. et al.. Lower limb ischaemia and reperfusion alters gut permeability. **Eur. J. Vasc. Surg.**, London, v.6, n.2, p.158-163. Mar. 1992.

COTRANS R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Cellular injury and cellular death. In: **ROBBINS pathologic basic of disease**. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Saunders, 1994, p.1-34.

CUNHA, M. S. et al.. Study of warm ischemia followed by reperfusion on a lower limb model in rats: effect of allopurinol and streptokinase. **Clinics**, São Paulo, v.60, n.3, p.213-220, 2005.

CUNNINGHAM, S. K.; KEAVENY, T. V.; FITZGERALD, P. Effect of allopurinol on tissue ATP, ADP and AMP concentrations in renal ischemia. **Br. J. Surg.**, Guildford, v.61, p.562-565, 1974.

DA SILVA, M. G.. **Estudo histológico e bioquímico sérico do alfa-tocoferol na lesão isquêmica e reperfusão em membros pélvicos de ratos**. Dissertação (Mestrado) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2004.

DAVID FILHO, R. et al.. Blockage of intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in prevention of reperfusion lesion in the skeletal musculature of EPM-1 Wistar rats. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.19, n.6, p.590-596, 2004.

DE BONO, D, P. Free radicals and antioxidants in vascular biology: the roles of reaction kinetics, environment and substrate turnover. **Q. J. Med.**, Oxford, v.87, p.445-453, 1994.

DEITCH, E.A.; MAEJIMA, K.; BERG, R. Effect of oral antibiotics and bacterial overgrowth on the translocation of gastrointestinal tract microflora in burned rats. **J. Trauma**, Baltimore, v.25, n.5, p.385-391, 1985.

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, 1987.

DEITCH, E. A et al.. Endotoxin-induced bacterial translocation: a study of mechanisms. **Surgery**, St. Louis, v.106, n.2, p.292-296, 1989.

DEITCH, E. A. et al.. Inhibition of endotoxin-induced bacterial translocation in mice. **J. Clin. Invest.**, New York, v.84, p.36-42, 1989.

DEITCH, E. A. et al.. Protein malnutrition predisposes to inflammatory-induced gut-origin septic states. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v.211, n.5, p.560, 1990.

DEITCH, E. A.; MORRISON, J.; BERG, R. D. Effect of hemorrhagic shock on bacterial translocation, intestinal morphology and intestinal permeability in conventional and antibiotic decontaminated rats. **Crit. Care Med.**, New York, v.18, p.529, 1990.

DI LISA, F.; SILVERMANN, H.S.; HANSFORD, R.G. Mitochondrial function and cell injury in single cardiac myocytes exposed to anoxia and re-oxygenation. **Transplant. Proc.**, New York, v.27, n.5, p.2829-2830, 1995.

DINARELLO, C. A. The multiple biologic activities of IL-1. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.311, n.22, p.1413. 1984.

DIRLIK, M. et al.. Effect of omithine on the ileal histology, nitric oxide production and lipid peroxidation in LPS-induced endotoxemia. **Acta Med. Okayama**, Okayama, v.57, n.3, p.177-122, 2003.

ERTEL, W.; FRIEDL, H. P.; TRENTZ, O. Multiple organ dysfunction syndrome (MODS) following multiple trauma: rationale and concept of therapeutic approach. **Eur. J. Pediatr. Surg.**, Stuttgart, v.4, p.243-248, 1994.

EVORA, P. R. B. et al.. **Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia 2000**. p. 434-437

FADEL, M. V. T. **Uso de corticosteróide na infecção grave de origem peritoneal por bactérias Gram-positivas ou Gram-negativas, experimentalmente induzida em camundongos**. 63 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1996.

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.19, p.59-65, 2004.

FAUST, K. B. et al.. Oxygen-derived free radical scavengers and skeletal muscle ischemic reperfusion injury. **Am. Surg.**, Atlanta, v.54, p.809-819, 1988.

FRANCISCO NETO, A.; SILVA, J. C. C. B.; FAGUNDES, D. J. Estudo das alterações oxidativas, da capacidade antioxidante total e do óxido nítrico, em ratos submetidos à isquemia e reperfusão de membros posteriores. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.20, p.134-139, 2005.

FREUDENBERG, M. A.; GALANOS, C. Bacterial lipopolisaccharides: structure, metabolism and mechanisms of action. **Int. Rev. Immunol.**, New York, v.6, p.207-221, 1990.

FRIDOVICHI, I. Superoxido dismutase. **Meth. Enzymol.**, New York, v.58, p.61-97, 1986.

GANGLOFF, S. C. et al.. Lipopolysaccharide structure influences the macrophage response via CD14-independent and CD14-dependent pathways. **Clin. Infect. Dis.**, Chicago, v.28, p.491-496, 1999.

GARCIA SORIANO, F. et al.. Inosine improves gut permeability and vascular reactivity in endotoxic shock. **Crit. Care Med.**, New York, v.29, n.4, p.703-708, 2001.

GARLID, K. D. et al.. Mitochondrial volume control. In: **Integration of mitochondrial function**. New York, Academic Press, 1988. p.257-276.

GATHIRAM, P.; GAFFIN, S.L.; BROCK-UTNE, J. G. Time course of entoxemia and cardiovascular changes in heat-stressed primates. **Aviat. Space Environ. Med.**, Washington, v.58, p.1071, 1987.

GORIS, R. J. A.; BOEKHOLTZ, W. K. F.; van BEBBER, I. P. T. Multiple-organ failure and sepsis without bacteria: an experimental model. **Arch. Surg.**, Chicago, v.121, p.897-901, 1986.



GRACE, P. A. Ischemia-reperfusion injury. Review. **Br. J. Surg.**, Guildford, v.81, p.637-647, 1994.

GRANGER, D. N. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.255, n.6, p.1269-1275, 1988.

GRANGER, D. N.; HOLLAWARTH, M. E.; PARKS, D. A. Ischemia – reperfusion injury: role of oxygen derived free radical. **Acta Physiol. Scand.**, Stockholm, n.548, p.47-63, 1986.

GREENE, E. L.; PALLER, M. S. Xanthine oxidase produce  $O_2$  in porthypoxic injury of renal epithelial cells. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.263, p.251-255, 1992.

GRISHAM, M. B. Role of reactive oxygen metabolites in inflammatory bowel disease. **Curr. Opinion Gastroenterol.**, Philadelphia, v.9, p.971-980, 1993.

GU, X. P. et al.. Pyrrolidine dithiocarbamate added to University of Wisconsin solution inhibits reperfusion injury after orthotopic liver transplantations in rats. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, Philadelphia, v.34, n.2, p.187-94, 2004.

HACKEL, D. B.; JENNINGS, R. B. The Heart. In: RUBIN, E.; FARBER, D.J. (Ed.). **Pathology**. Philadelphia: Lippincott, 1988. p.515-525.

HAIMOVICI, G.O. Myophatic-nefrotic-metabolic syndrome associated with massive acute arterial occlusions. **J. Cardiovasc. Surg.**, St. Louis, p.589-600, 1970.

HAJAR, N.; REPKA, J. C. D.; CANAN JUNIOR, L. W. Ação do pneumoperitônio com dióxido de carbono na translocação bacteriana em ratos. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.17, n.3, p.181-188, 2002.

HALLIWEL, B. Free radicals and antioxidants: A Personal view. **Nutr. Rev.**, New York, v.52, p.253-265, 1994.

HALLIWEL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, London, v. 344, p.721-724, 1994.

HALLIWEL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: Where are we now? **J. Lab. Clin. Med.**, St. Louis, v.119, p.568-620, 1992.

HALLIWEL, B. Oxidants and human disease: some new concepts. **FASEB J.**, Bethesda, v.1, p.358-364, 1987.

HALLIWEL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. 2<sup>nd</sup>. Oxford: Clarenton Press, 1989.

HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. I. **DNA and free radical**. London: Ellis Horwood, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch. Biochem. Biophys.**, London, v.246, p.501-514, 1986.

HARRIS, K. et al.. Metabolic response of skeletal muscle to ischemia. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.250, p.H213-H220, 1980.

HARRIS, L. M. et al.. Ruptured abdominal aneurism: factors affecting mortality rates. **J. Vasc. Surg.**, St Louis, v.14, p.812-820, 1991.

HEARSE, D. J.; HUMPREY, W. G.; BULLOCK, G. R. The oxygen paradox and the calcium paradox: two facets of the same problem? **J. Moll. Cell Cardiol.**, 641-668, 1978.

HEBEL, R.; STROMBERG, M. W. The circulation system. In: HEBEL, R, STROMBERG, M.W. **Anatomy of laboratory rat**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1976. p.91.

HENDERSON, B.; WILSON, M. Modulins: a new class of cytokine-inducing, pro-inflammatory bacterial virulence factor. **Inflamm. Res.**, Basel, v.44, p.187-197, 1995.

HINDER, R. A.; STEIN, H. J. Oxygen derived free radicals. **Arch. Surg.**, Chicago, v.126, p.104-105, 1997.

IHNKEN, K. et al.. Experimental application of controlled limb reperfusion after incomplete ischemia. **Br. J. Surg.**, Guildorfd, v.83, p.803-809, 1996.

INTERNATIONAL COMITEE ON VETERINARY GROSS ANATOMICAL NOMENCLATURE. **Nomina anatomica veterinária**. 3.ed. New York: Ithaca, 1985.

JACOB, S.; WEIDEL, H.; GORDON, E. Bacterial action in development of irreversibility to transfusion in hemorrhagic shock in the dog. **Ann. J. Physiol.**, Bethesda, v.179, p.523, 1954.

JANSEN, N. J. G. et al.. Methylprednisolone prophylaxis protects against endotoxin-induced death in rabbits. **Inflammation**, New York, v.15, n.2, p.91-101, 1991.

JENSEN, S.L.; SANDERMAN, J. Compartment syndrome and fasciotomy in vascular surgery. A review of 57 cases. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, London, v.13, p.48-53, 1997.

JIALAL, I.; GRUNDY, S.D. Influence of antioxidant vitamins on LDL oxidation, **Ann. NY Acad. Sci.**, New York, v.669, n.30, p.237-248, 1992.

KATZ, A. M.; RENTER, H. Cellular calcium and cardiac cell death. **Am. J. Cardiol.**, New York, v. 44, p.188-90, 1979.

KATZ, D. J.; STANLEY, J. C.; ZELENOCK, G. B. Operative mortality rates for intact and ruptured abdominal aortic aneurism in Michigan: an eleven-year statewide experience. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v.19, n.5, p. 804-815, 1994.

KERRIGAN, C. L.; STOTLAND, M. A. Ischemic reperfusion injury: a review. **Microsurgery**, New York, v.14, p.165-175, 1993.

KNIGHT, K. R. et al.. Ischaemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle is reduced by N-nitro-L-arginina metil ester and dexametasona. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v.332, p.273-278, 1997.

KNOBEL, E. Choque séptico e mecanismos de agressão tecidual. In: \_\_\_\_\_. **Condutas no paciente grave**. São Paulo: Atheneu, 1998. p.18-23.

KOIKE, K. et al.. Gut ischaemia-reperfusion produces lung injury independent of endotoxin. **Crit. Care Med.**, Baltimore, v.22, n.9, p.1438-1444. Sept. 1994.

KONO, Y.; OSAWA, K.; TANAKA, J. Significance of mitochondrial enhancement in restoring hepatic energy charge after revascularization of isolated ischemic liver. **Transplantation**, Baltimore, v.32, p.150-155, 1982.

KORTHIUS, R. J. et al.. Vascular injury in dogs during ischemia/reperfusion: improvement with ATP-MgCl<sup>2</sup> pretreatment. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.254, p.H702-H708, 1988.

KORTHUIS, R. J.; GRISHAM, M. B.; GRANDER, D. N. Leucocyte depletion attenuates vascular injury in post ischemic skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.254, p.H823-H827, 1988.

LANGDALE, L. A. et al.. Sustained tolerance to lipopolysaccharide after liver ischemic-reperfusion injury. **Shock**, Augusta, v.19, n.6, p.553-558, 2003.

LAWLER, J. M.; SONG, W.; DEMAREE, S.R. Hindlimb unloading increase oxidative stress and disrupts antioxidant capacity in skeletal muscle. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v.35, p.9-16, 2003.

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

LERMAN, A.; BURNETT, J. C. Intact and altered endothelium in the regulation of vasomotor tonus. **Circulation**, Dallas, v.82, suppl. 3, p.12-19, 1992.

LeVOYER, T. et. al. Alterations in intestinal permeability after thermal injury. **Arch. Surg.**, Chicago, v.127, p.26-30, 1992.

LI, C.; JACKSON, R. M. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia-reoxygenation injury. **Am. J. Physiol. Cell**, Bethesda, v.282, p.277-341, 2002.

LILLEHEI, R. C. The intestinal factor in irreversible hemorrhagic shock. **Surgery**. St. Louis, v.42, p.1043, 1957.

LIN, A. et al.. Attenuation of ischemia-reperfusion injury in a canine model of autologous renal transplantation. **Transplantation**, Baltimore, v.78, p.654-659, 2004.

LINDSAY, T. F. et al.. The effect of ischemic-reperfusion on adenine nucleotide metabolism and xantine oxidase production in skeletal muscle. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v.12, p.8-15, 1990.



LOFTIS, L. L. et al.. Brief hypoxic stress supresses postbacteremic NF-Kappa $\beta$  activation and TNF- $\alpha$  bioactivity in perfused liver. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.**, Bethesda, v.279, p.99-108, 2000.

MA, J. W.; WELLS, C. L.; DEITCH, E. A. Genetic susceptibility to mucosal damage leads to bacterial translocation in a murine burn model. **J. Trauma**, Baltimore, v.29, p.1245-51, 1989.

MALIS, C. D.; BONVNTRE J. V. Susceptibility of mitochondrial membranes to calcium and reactive oxygen species: implications of ischemic and toxic tissue damage. **Prog. Clin. Biol. Res.**, New York, v.288, p.235-259, 1988.

MARSCHALL, J. C. et al.. The gastrointestinal tract: the "undrained abscess" of multiple organ failure. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v.218, n.2, p.111-119, 1993.

MARTINS, I. E. **Efeito do tempo da isquemia sobre a translocação bacteriana em ratos com isquemia segmentar de cólon descendente**. Curitiba 1997. Tese (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1997.

MASSBERG, S.; MESSNER, K. The nature of ischemic/reperfusion injury. **Transplant. Proc.**, New York, v.30, p.4217-4223, 1998.

MATSUDA, F. et al.. Xanthine oxidase inhibition attenuates kupffer cell production of neutrophil chemoattractant following ischemia-reperfusion in rat liver. **Hepatology**, Baltimore, v.28, p.1578-1587, 1998.

MCAFEE, M. et al.. Endothelial dysfunction following global cardiac ischemia and reperfusion. **Surg. Forum**, Chicago, v.41, p.301-311, 1990.

McCORD, J. M. Oxygen-derived free radical in post ischemic tissue injury. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.312, p.159-167, 1985.

McCORMACK, J.G.; HALESTRAP, A.P.; DENTRON, R.M. Role calcium ions regulation of mammalian intra mitochondrial metabolism. **Physiol. Rev.**, Bethesda, v.70, p.391-495, 1990.

McNULTY JÚNIOR, W. P.; LINARES, R. Hemorrhagic shock of germ free rats. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.1968, p.141, 1960,

MEERSON, F. Z.; KAGAN, V. E.; KOZHOV, Y. P. The role of lipid peroxidation in the pathogenesis of ischemic damage and antioxidant protection of the heart. **Basic Res. Cardiol.**, Darmtadt, v.77, p.465-485, 1982.

MELLA, L. Mechanism and physiological significance of calcium transport across mammalian mitochondrial membranes. In: BRONNER. F.; KLEINZELBER, A. **Current topics in membranes and transports**. New York: Academic Press, 1977. p 321-62.

MENGER, M. D. et al.. Microvascular ischaemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.263, n.6, p.1901-1906, Dec. 1992.

MONCADA, S.; HIGGS, I A. The L-arginina-nitric oxide pathway. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.329, p.2002-2011, 1993.

MOORE, F. A.; MOORE, E. E. Evolving concepts in the pathogenesis of postinjury multiple organ failure. **Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.75, n.2, p.257-277, 1995.

MOORE, F. A.; MOORE, E. E.; JONES, T. N. TEN versus TPN following major abdominal trauma: reduced septic morbidity. **J. Trauma**, Baltimore, v.29, p.916-917, 1989.

MOREHOUSE, J. L.; SPECIAL, R. D.; STEWART, J.J. Translocation of indigenous bacteria from the gastrointestinal tract of mice after oral ricinoleic acid treatment. **Gastroenterology**, Baltimore, v.91, p.673-682, 1986.

MORENO, J. B. **Efeito do alfatocoferol na atuação das lesões da isquemia-reperfusão em membro posterior do rato**. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, Botucatu, 1991.

NAGLERAL, L.; ZWEIFACH, B. W. Pathogenesis of experimental shock: II Absence of endotoxic activity in blood of rabbits subjected to graded hemorrhage. **J. Exp. Med.**, New York, v.114, p.195, 1961.

NAVARATNAM, R. L. N. et al.. Endotoxin increases mesenteric vascular resistance and bacterial translocation. **J. Trauma**, Baltimore, v.30, n.9, p.1104-1115, 1990.

NAYLER, W. G.; POOLE-WILSON, P. A.; WILIANS, A. Hypoxia and calcium. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v.11, p.683-706, 1979.

NICHOLS, W. W. et al.. Reduction in coronary vasodilator response follow coronary occlusion and reperfusion in anesthetized dog: Role of endothelium derived relaxing factor, myocardial neutrophil infiltration and prostaglandins. **J. Mol. Cell. Cardiol.**, v.20, p.943-954, 1988.

NIEUWENHUIJZEN, G. A. P.; DEITCH, E. A.; GORIS, J. A. Infections, the gut and the development of the multiple organ dysfunction syndrome. **Eur. J. Surg.**, Stockholm, v.162, p. 259-273, 1996.

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

O'DWYER, S.; MICHIE, H. R.; ZIEGLER, T. R. A single dose of endotoxin increases intestinal permeability in healthy humans. **Arch. Surg.**, Philadelphia, v.123, p.1459-1464, 1988.

OGILVIE, R. W.; ARMSTRONG, R. B.; BAIRD, K. E. Lesion the rat soleus muscle following eccentrically based exercises. **Am. J. Anat.**, London, v.182, p.335-346, 1988.

OLSEN, P. S. et al.. Surgery of abdominal aortic aneurisms: a survey of 656 patients. **J. Cardiovasc. Surg.**, Torino, v.32, p. 636-642, 1991.

OREDSSON, S.; PLATE, G.; QVARFORDT, P. Allopurinol – a free radical scavenger – reduces reperfusion injury in skeletal muscle. **Eur. J. Vasc. Surg.**, London, v.5, p.47-52, 1991.

OURIEL, K. Acute limb ischemia. In: RUTHERFORD, R.B. *et al.* (Ed.). **Vascular surgery**, 4<sup>th</sup>. Philadelphia: Saunders, 2000. p.813-821.

PALLER, M.S.; HOIDAL, J. R.; FERRIS, T. Oxygen free radical in ischemic acute renal failure in the rat. **J. Clin. Invest.**, New York, v.74, p.1156-1164, 1984.

PAPE, C. *et al.* Increased gut permeability after multiple trauma. **Br. J. Surg.**, Guildford, v.81, p.850-852, 1994.

PARILLO, J. E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.328, n.20, p.1471-1478, 1993.

PARKS, D.A. *et al.* Ischemic injury in small intestine. Role of superoxide radicals. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 82, p.9-15, 1982.

PARKS, D. A.; BULKLEY, G. B.; GRANGER, D. N. Role of oxygen free radicals in shock, ischemic and organ preservation. **Surgery**, St. Louis, v.94, p. 428-432, 1983.

PEARSON, P. J.; SCHAFF, H. V.; VANHOUTE, P. M. Acute impairment of endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets following reperfusion injury in canine coronary arteries. **Circulation Res.**, Dallas, v.67, p.385-393, 1990.

PERALTA, C. *et al.* Ischemic preconditioning: a defense mechanism against the reactive oxygen species generated after hepatic ischemia reperfusion. **Transplantation**, Baltimore, v.73, p.1203-1211, 2002.

PERRY, M. O. Compartment syndrome and reperfusion injury. **Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.68, p.853-864, 1988.

PERRY, M. O. Oxygen free radical scavengers in acute ischemia and reperfusion syndromes. In: ERNST; C.N, STANLEY; J.C. **Current therapy in vascular surgery**. 2<sup>nd</sup>. Philadelphia: Decker, 1991. p.600-604.

PERRY, M. O.; FANTINI, G. Ischemia: profile of an enemy. Reperfusion injury of skeletal muscle. **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v.6, p.231-234, 1987.

PICCINATO, C. E. **Estudo do conteúdo de cálcio, magnésio e potássio mitocondriais de músculo-esquelético de ratos submetidos à isquemia e reperfusão**. Tese (Livre-Docência) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP, Ribeirão Preto, 1991.

PICCINATO, C. E. *et al.* Skeletal muscle ischemia and reperfusion in rats increase lipid peroxidation in rats. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.19, p.578-581, 2004.

PINE, R.; NEUGEBAUER, E. A. M. Steroid controversy in sepsis and septic shock: a meta-analysis. **Crit. Care Med.**, New York, v.23, p.1294-1299, 1995.



PÓ, J. F. **Isquemia e reperfusão na oclusão aórtica em cães**: alterações hemodinâmicas, ação de radicais livres e lesões estruturais. Dissertação (Mestrado)-Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 1995.

POLI FIGUEIREDO, L. F.; CRUZ JÚNIOR, R. J.; MORSCH, R. D. esvascularização e reperfusão no trauma vascular. In: Murilo. **Trauma vascular**. Rio de Janeiro: Revinter, 2005. p 628-633

PONUHALINA, E. V. et al.. Lipid peroxidation and the antioxidant blood system in dynamics of pestilential and choleraic intoxication. **Patol. Fiziol. Eksp. Ter.**, Moskva, v.3, p.17-18, 2001.

PUNCH, J. et al.. Xantina-oxidase: its role in the no-reflow phenomenon. **Sugery**, St Louis, v.111, p.169-176, 1992.

QUINHONHEZ-BALDREH, W. J. et al.. Skeletal muscle function after ischemia: "No reflow" versus reperfusion injury. **J. Surg. Res.**, New York, v.51, p.5-12, 1991.

RADI, R. et al.. Peroxynitrite induced membrane peroxidation: the cytotoxic potential of superoxid and oxid. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.288, p.481-487, 1991.

REIMER, K, A.; JENNINGS, R. B.; TATTUM, A. H. Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic functional and ultra structural studies. **Am. J. Cardiol.**, New York, v.52, p.72A-81A, 1983.

REYNOLDS, J. V. Gut barrier function in the surgical patient. **Br. J. Surg.**, Guildford, v.83, p.1668-1669, 1996.

RHODEN, E. L. Efeito do alopurinol na síndrome da isquemia e reperfusão renal : estudo experimental em ratos . **Catalogo da produção científica** – Dissertação de teses – 1998 . Porto Alegre: UFRGS, 1998.

RHODERN, E. L. et al.. Efeitos do alopurinol sobre a lipoperoxidação de membranas celulares renais na síndrome de isquemia e reperfusão: estudo experimental em ratos. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.13, p.73-79, 1998.

RICCI, M. A. et al.. Are free radical scavengers beneficial in the treatment of compartmental syndrome after acute arterial ischemia? **J. Vasc. Surg.**, St. Louis, v.9, p.244-250, 1989.

RICE-EVANS, C.A. Formation of free radicals and mechanisms of action in normal biochemical processes and pathological states. In: RICE-EVANS, C.A.; BURTON, R.H. **Free radical damage and its control**. Amsterdam: Elsevier, 1994. p.129-151.

ROSENTHAL, S. M. Experimental chemotherapy of burns and shock. Production of traumatic shock in mice and therapy with mouse serum and sodium salts. **Public Health Rep.**, Boston, v.58, n.39, p.1429-1436, 1943.

ROUMEN, R. M. H. et al.. Endotoxemia after major vascular operations. **J. Vasc. Surg.**, St Louis, v. 18, n.5, p. 734-737, Nov. 1993.

ROY, R. S.; McCORD, J. M. The pathophysiology of superoxide roles in inflammation and ischemic. **Can. J. Physiol. Pharmacol.**, Ottawa, v.60, p.1346-1352, 1982.

RUDERMAN, N. B. et al.. Effect of starvation on muscle glucose metabolism: studies with isolated perfused rat hindquarter. **Fed. Proc.**, Bethesda, v.36, p.171-176, 1977.

RULEIN, B. B.; SMITH, A.; LIAUW, S. Complement activation and white cell sequestration in post ischemic skeletal muscle. **Am. J. Physiol.**, Bethesda, v.259, p.H525-H531, 1990.

RUSH JÚNIOR, B. F.; REDAN, J. A.; FLANAGAN JÚNIOR, J. J. Does the bacteremia observed in hemorrhagic shock have clinical significance? **Ann Surg.** Philadelphia, v.210, p.342-356, 1989.

RUSH JÚNIOR; B. F. et al.. Endotoxemia and bacteremia during hemorrhagic shock: the link between trauma and sepsis? **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 207, n. 5, p. 549-554, 1988.

SAADIA, M. et al.. Gut barrier function and the surgeon. **Br. J. Surg.**, Guildford, v.77, p.487, 1990.

SAADIA, R. Trauma and bacterial translocation. **Br. J. Surg.**, Guilford, v.82, p.1243-1244, 1995.

SAEZ, J. C. et al.. Torniquet shock in rats: effects of allopurinol on biochemical changes of the gastrocnemius muscle subjected to ischemia followed by reperfusion. **Biochem. Med. Metab. Biol.**, New York, v.35, p.199-209, 1986.

SARAFIAN, T. A.; BREDESEN, D. E. Is apoptosis mediated by reactive oxygen species? **Free Radic. Res.**, Yverdon, v.20, p.1-6, 1994.

SAUEBEIN, L. et al.. Effect of anthocyanins contained in a blackberry extract on circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat. **Planta Med.**, Stuttgart, v.70, p.745-752, 2004.

SECCOMBE, J.F.; SCHAFF, H.V. Reperfusion injury. In: *Vasoactive factors produced by endothelium: physiology and surgical implications*. Austin: R.G. Landes 1994. p.27-41.

SHEN, A. C.; JENNINGS, R. B. Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. **Am. J. Pathol.**, New York, v.67, p.417-440, 1972.

SIES, H. **Oxidative stress, oxidants and antioxidants**. London: Academic Press, 1991.

SILVA E., OTHERO J., SOGAYAR A. C. B. **Consenso Brasileiro de Sepsis, 2003**. p 6-10.

SILVA J. C. C. B.; BURIHAN E. Diagnóstico clínico da isquemia crítica dos membros. **Rev. Bras. Clin. Ter.**, São Paulo, v.25, p.71-79, 1999.

SILVEIRA, M.; YOSHIDA, W.B. Isquemia e reperfusão em músculo esquelético: mecanismo de lesão e perspectiva de tratamento. **J. Vasc. Bras.**, Rio de Janeiro, v.3, p.367-378, 2004.

SIMON, G. L.; GORBACH, S. L. Intestinal microflora. **Med. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 66, n. 3, p. 557-575, 1982.

SLATER, T. F. Overview of methods used for detecting lipid peroxidation. **Meth. Enzimol.**, New York, v.105, p.283-293, 1984.

SMITH, A. et al.. Role of extracellular calcium in ischemia/reperfusion injury in the skeletal muscle. **J. Surg. Res.**, New York, v.49, p.153-156, 1990.

SOUZA, A.C.; PICCINATO, C.E.; CHERRI, M.T. Mecanismo celulares e moleculares da lesão de isquemia e reperfusão de músculo esquelético. **Cir. Vasc. Angiol.**, São Paulo, v.17, p.80-86, 2001.

SOUZA-MORAES, M. R. et al.. Effect of antibodies to intercellular adhesion molecule type I on the protection of distant organs during reperfusion syndrome in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, Ribeirão Preto, 36, p.605-612, 2003.

SPARK, J.I. et al.. The regulation of neutrophil activation and adhesion during femorodistal bypass surgery. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.**, London, v.13: 407-412, 1997.

SPRONG, R. C. et al.. Dimethylthiourea protects rats against Gram-negative sepsis and decreases tumor necrosis factor and nuclear factor kB activity. **J. Lab. Clin. Med.**, St. Louis, v.129, p.470-481, 1986.

STADMAN, E. R.; OLIVER, C. H. Metal-catalysed oxidation of proteins. Physiological consequences. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.286, p.901-905, 1991.

STALKE, P. H. **Modelo experimental de endotoxemia em ratos submetidos à isquemia e reperfusão de membros caudais**. Dissertação (mestrado) - do Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2001.

STEFFEN, E. K.; BERG, R. D. Relationship between cecal population levels of indigenous bacteria and translocation to the mesenteric lymph nodes. **Infect. Immun.**, Washington, v.39, n. 3, p.1252-1259, Mar.1983.

STHAL, R. F. et al.. Cardiac ischemia and endothelial function in the isolated rabbit heart. **J. Surg. Res.**, New York, v.47, p. 97-104, 1980.

STIRPE, F.; DELLA CORTE, E. The regulation of the rat liver xantina oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.244, p.3855-3863, 1969.

STONE, P. H. et al.. Calcium channel blocking agents in treatment of cardiovascular disorders. II. Hemodynamic effects and clinical implications. **Ann. Intern. Med.**, Philadelphia, v. 93, p.886-904, 1980.



STROCK, P. E.; MAJNO, G. Vascular responses to experimental tourniquet ischemia. **Surg. Gynecol. Obstet.**, Chicago, p. 309-318, Aug. 1969.

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.411-413, 1996.

SZABO, C.; ZINGARELLI, B.; SALZMAN, A. L. Role of poly-ADP ribosyltransferase activation in the vascular contractile and energetic failure elicited by endogenous and endogenous nitric oxide and peroxynitrite. **Circ. Res.**, Dallas, v.78, p.1051-1063, 1996.

TRAYA, G. **Efeito do tempo de obstrução biliar extra-hepática sobre a translocação bacteriana, endotoxemia e fator de necrose tumoral alfa: estudo experimental em ratos.** Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1998.

TRITTENWEIN, G. et al.. Lipid peroxidation during initiation of extracorporeal membrane oxygenation after hypoxia in endotoxemic rabbits. **Perfusion**, London, v.14, n.1, p.49-57, 1999.

UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal. Biochem.**, New York, v.86, p.271-278, 1978.

ULEVITCH, R. J.; TOBIAS, P. S. Receptor-dependent mechanism of cell stimulation by bacterial endotoxin. **Ann. Rev. Immunol.**, v.13, p.437-439, 1995.

URATA, K. et al.. Role of kupffer cells in the survival after rat liver transplantation with long portal vein clamping times. **Transpl. Int.**, v.13, p.420-427, 2000.

VAN GOOR, H. et al.. Translocation of bacteria and endotoxin in organs donors. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 129, p.1063-1066, Oct 1994.

VIANA, J.X. **Plaquetopênia e fenômeno de Sanarelli-Schwartzman.** Curitiba, 301 f. Tese (Concurso para Professor Catedrático) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1948.

VIDIGAL J. **Estudo morfológico do músculo sóleo de ratos na isquemia e reperfusão sob oxigenação hiperbárica.** Dissertação (Mestrado) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2006.

WATANABE, T. et al.. The role of HMGB-1 on the development of necrosis during hepatic ischemia and hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. **J. Surg. Res.**, New York, v.124, p.59-66, 2005.

WEBSTER, R. S. **O papel do pré-condicionamento isquêmico na lesão de isquemia e reperfusão em músculo grácil de ratos.** Dissertação (Mestrado) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2006.

WELBOURN, C.R.B. et al.. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury: central role of neurotrophyls. **Br. J. Surg.**, Guildorfd, v.78, p.651-655, 1991.

WELCH M. et al.. Histological study of colonic ischaemia after aortic surgery. **Br. J. Surg.**, Guildford, v.85, p.1095-1098, 1998.

WELLS, C. L. Relationship between intestinal bacteria microecology and the translocation of intestinal bacteria. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Netherlands, v.58, n.2, p.87-93, 1990.

WELLS, C. L.; MADDAUS, M. A.; SIMMONS, R. L. Proposed mechanisms for the translocation of intestinal bacteria. **Rev. Infect. Dis.**, Chicago, v.10, n.5, p.958-967, 1988.

WEST, M. A.; KELLER, G. A.; HYLAND, B. J. Hepatocyte function in sepsis: Kupffer cells mediate a biphasic protein synthesis response in hepatocytes after exposure to endotoxin or killed. *Escherichia coli*. **Surgery**, St. Louis, v.98, p.388-394, 1985.

WILSON, D. R. et al.. Sequential changes in mitochondrial function in ischemic acute renal failure in the rat. **Kidney Int.**, New York, v.23, p.209-217, 1983.

WONG, T. C. A study on the generalized Schwartzman reaction in pregnant rats induced by bacterial endotoxin. **Am. J. Obstet. Gynecol.**, St. Louis, v.84, n.6, p.786, 1962.

WROGEMANN, K.; JACOBSON, B. E.; BLANCHAER, M. C. On the mechanism of a calcium associated defect of oxidative phosphorylation in progressive muscular dystrophy. **Arch. Biochem. Biophys.**, New York, v.159, p.267-278, 1973.

YANG, H. et al.. Oxygen free radical injury and its relation to bacterial and endotoxin translocation after delayed fluid resuscitation: clinical and experimental study. **Chin. Med J.**, Peking, 110, p.118-124, 1997.

YASSIN, M. M. I. et al.. Lower limb ischaemia-reperfusion alters gastrointestinal structure and function. **Br. J. Surg.**, Guildford, v.84, p.1425-1429, 1997.

YASSIN, M. M. I. et al.. Lower limb ischaemia-reperfusion injury causes endotoxaemia and endogenous antiendotoxin antibody consumption but not bacterial translocation. **Br. J. Surg.**, Guildford, v.85, p.785-789, 1998.

YASSIN, M.M.I. et al.. Mortality following lower limb ischaemia-reperfusion: a systemic inflammatory response? **World J. Surg.**, New York, v.20, n.8, p.961-967, Oct. 1996.

YOSHIDA, W. B. et al.. Effect of  $\alpha$ -tocopherol, taurine and selenium on the attenuation of ischemia/reperfusion injury of splanchnic organs. **Cardiovasc. Surg.**, London, v.6, p.178-187, 1998.

YOSHIDA, W. B. Fisiopatologia da isquemia e reperfusão. In: MAFFEI, F.H.A. et al.. 2002 **Doenças vasculares periféricas**. 3.ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2002 p. 253-257.

YOUN, Y. K. et al.. Pentoxifyline does not prevent endotoxin induced lung and liver lipid peroxidation in the adult sheep. **Circ. Shock**, Baltimore, v.39, p.39-43, 1993.

YOUNES, M. et al.. Inhibition of lipid peroxidation by superoxide dismutase following regional intestinal ischemia and reperfusion. **Res. Exp. Med.**, Berlin, v.187, n.9, p.65-83, 1992.

ZAGER, R. A.; GMUR, D. J. Effects of xanthine oxidase inhibition on ischemic acute renal failure. **Acta Physiol.**, Oxford, v.257, p.953-958, 1989.

ZENI NETO, C. et al.. Translocação bacteriana em ratos com oclusão intestinal. Efeito do nível da oclusão e da isquemia. **Rev. Col. Bras. Cir.**, Rio de Janeiro, v.24, p.111-118, 1997.

ZHANG, J.; DAWSON, V. L.; DALSON T. M. Nitric oxide activation of poly (ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. **Science**, Washington, v.263, p.687-689, 1994.

ZIMMERMAN, B. J.; GRANGER, D. N. Reperfusion injury. **Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v.72, n.1, p.65-83, 1992.



**ANEXOS**

## ANEXO 1 – PARECER DA COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA EXPERIMENTAL

### Parecer da Comissão de Ética em Pesquisa Experimental

Protocolo 08/04

**De** Comissão de Ética em Pesquisa em Animais  
**Para** Dr. Ricardo Zanetti Gomes  
**Assunto** Parecer (referência projeto de tese)  
**Data** 31 de agosto de 2004.

#### 1. Título do projeto

- Influência do alopurinol nos efeitos da isquemia e reperfusão de membros caudais em ratos Wistar

#### 2. Relator

- Dr. João Eduardo Leal Nicoluzzi

#### 3. Animais a serem utilizados

- 60 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, *Rodentia mammalia*), da linhagem Wistar
- Comentários do relator: amostra satisfatória e estatisticamente validada

#### 4. Avaliação dos procedimento (s) previsto (s) :

##### 4.1. Condições gerais do experimento

- Comentários do relator: Satisfatória e de acordo com as normas do COBEA

##### 4.2. Concepção ética do estudo

###### 4.2.1. Anestesia:

- Associação xilazina 10 mg/Kg associado a Ketamina 50 mg/Kg, sob a forma de injeção intramuscular em região da coxa.
- Comentários do relator: conforme recomendações de :American Veterinary Society Medical Association – 2000 Report of the AVMA Panel on Euthanasia

###### 4.2.2. Procedimento cirúrgico:

- Para a laparotomia foi procedida em cada rato uma incisão mediana xifopúbica com abertura de todos os planos da parede abdominal e exposição da cavidade abdominal. As alças intestinais foram afastadas para fora da cavidade peritoneal e protegidas com gazes esterilizadas umidecidas em solução salina isotônica.
- Com o auxílio de tesoura dissecou-se o peritônio parietal posterior e separou-se a veia cava da aorta infra-renal.
- Ao término deste período todos os ratos foram novamente submetidos ao procedimento anestésico como anteriormente descrito e após a constatação da instalação do plano anestésico, pela perda de reflexos nociceptivos, conforme descrito por Bacelar foram procedidas primeiramente a coleta de sangue em volumes que induziram a eutanásia por exangüinação dos ratos. A seguir foram feitas as coletas de baço, fígado e também linfonodos mesentéricos e segmentos intestinais.
- No grupo controle, conforme demonstrado na tabela 1, os 30 ratos foram separados em três sub-grupos com dez ratos cada, isquemia 2 horas (C-2h), isquemia 3 horas (C-3h) e simulação (C-S).
- Nos grupos C-2h e C-3h foi procedido o clampeamento aórtico por duas e três horas respectivamente. Durante estes períodos de isquemia as bordas das feridas foram aproximadas com três pontos de Vicryl® 000 (Johnson & Johnson) para evitar perda de líquido por evaporação. O fechamento da ferida cirúrgica foi feito com sutura contínua em plano único com Vicryl® 000 (Johnson & Johnson) e imediatamente tratados por via oral com soro fisiológico. No grupo CS foi procedida somente a dissecação da veia cava da aorta infra-renal, tratamento com soro fisiológico e a seguir o fechamento da ferida cirúrgica foi feito como anteriormente descrito.
- A hidratação dos animais foi mantida com solução salina de cloreto de sódio a 0,9% na dose de 3ml/kg/hora injetada por via subcutânea na região dorsal.
- No grupo alopurinol, conforme demonstrado na tabela 1, os 30 ratos foram separados em três sub-grupos com dez ratos cada, isquemia 2 horas (AI2h), isquemia 3 horas (AI3h) e simulação (CS).

- Nos grupos AI2h e AI3h, de forma similar ao grupo controle, foi procedido o clampeamento aórtico por duas e três horas respectivamente. Durante estes períodos de isquemia as bordas das feridas foram aproximadas com três pontos de Vicryl® 000 (Johnson & Johnson) para evitar perda de líquido por evaporação. O fechamento da ferida cirúrgica foi feito com sutura contínua em plano único com Vicryl® 000 (Johnson & Johnson) e imediatamente tratados por via oral com alopurinol. No grupo AS foi procedida somente a dissecação da veia cava da aorta infra-renal, tratamento com alopurinol e a seguir o fechamento da ferida cirúrgica foi feito como anteriormente descrito.
- A hidratação dos animais foi mantida com solução salina de cloreto de sódio a 0,9% na dose de 3ml/kg/hora injetada por via subcutânea na região dorsal.
- Comentários do relator: satisfatório

#### 4.2.3. Analgesia e Antibioticoterapia:

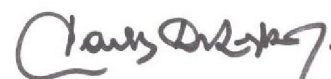
- analgésico -dipirona 25 mg/rato via oral imediatamente após o ato cirúrgico.
- Comentários do relator: satisfatório

#### 4.2.4. Tratamentos:

- A solução de alopurinol foi preparada a partir de comprimidos do medicamento Zyloric® (Glaxo Wellcome) macerados em gral e pistilo, posteriormente o pó obtido foi pesado e solubilizado em solução fisiológica e administrada na dose de 100mg/kg para cada rato do grupo correspondente, uma hora antes da indução de isquemia por via oral.
- Comentários do relator: satisfatório

#### 5. Parecer Final :

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



Dr. João Carlos Domingues Repka



ANEXO 2 – RESULTADOS OBTIDOS EM TRIPLICATAS NAS DOSAGENS DE TBARS EM AMOSTRAS DE INTESTINO DE RATOS.

TABELA 16 – RESULTADOS OBTIDOS EM TRIPLICATAS NAS DOSAGENS DE TBARS EM AMOSTRAS DE INTESTINO DE RATOS.

Ratos Testes	Controles									Alopurinol								
	C-2h			C-3h			C-S			A-2h			A-3h			A-S		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	0,81	0,83	0,79	0,88	0,91	0,87	0,31	0,29	0,32	0,39	0,38	0,35	0,41	0,43	0,43	0,38	0,39	0,38
2	0,67	0,66	0,69	0,78	0,81	0,76	0,37	0,38	0,36	0,42	0,39	0,34	0,42	0,45	0,43	0,40	0,39	0,38
3	0,78	0,75	0,75	0,87	0,83	0,83	0,44	0,39	0,41	0,39	0,35	0,33	0,38	0,39	0,41	0,41	0,38	0,37
4	0,84	0,83	0,88	0,85	0,84	0,85	0,28	0,29	0,26	0,35	0,36	0,39	0,33	0,35	0,38	0,35	0,37	0,39
5	0,73	0,71	0,73	0,93	0,89	0,92	0,40	0,38	0,36	0,36	0,37	0,36	0,37	0,38	0,36	0,35	0,36	0,35
6	0,69	0,65	0,71	0,92	0,90	0,91	0,38	0,35	0,34	0,28	0,30	0,29	0,27	0,29	0,31	0,28	0,27	0,28
7	0,61	0,59	0,73	0,84	0,86	0,86	0,44	0,46	0,44	0,40	0,42	0,43	0,41	0,44	0,43	0,44	0,46	0,45
8	0,73	0,71	0,71	0,82	0,77	0,84	0,38	0,37	0,36	0,42	0,41	0,42	0,42	0,43	0,42	0,41	0,39	0,41
9	0,69	0,69	0,65	0,74	0,73	0,76	0,44	0,46	0,45	0,39	0,38	0,39	0,38	0,39	0,38	0,35	0,37	0,36
10	0,68	0,66	0,64	0,76	0,78	0,77	0,41	0,39	0,40	0,39	0,36	0,37	0,43	0,42	0,40	0,40	0,42	0,41
p	<b>0,8143</b>			<b>0,9656</b>			<b>0,838</b>			<b>0,7318</b>			<b>0,7331</b>			<b>0,9892</b>		
Média	<b>0,720</b>			<b>0,836</b>			<b>0,377</b>			<b>0,373</b>			<b>0,391</b>			<b>0,378</b>		
Desvio padrão	<b>0,070</b>			<b>0,059</b>			<b>0,055</b>			<b>0,038</b>			<b>0,045</b>			<b>0,045</b>		

## ANEXO 3 - RELATÓRIOS ESTATÍSTICOS DAS VALIDAÇÕES PROCEDIDAS ENTRE OS RESULTADOS DAS DOSAGENS DE TBARS EM TRIPLICATAS

### 3.1. Grupo Controle 2 horas – triplicatas A, B e C

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

**The P value is 0.8143, considered not significant.**

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

Post tests

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

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

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

Bartlett statistic (corrected) = 0.1238

The P value is 0.9400.

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

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

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

Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
A	0.1811	>0.10	Yes
B	0.1897	>0.10	Yes
C	0.1885	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	2	0.002167	0.001083
Residuals (within columns)	27	0.1413	0.005234

Total 29 0.1435  
 F = 0.2070 =(MStreatment/MSresidual)

Summary of Data

Group	Number of Points	Standard Mean	Standard Deviation	Error of Mean	Median
A	10	0.7230	0.07009	0.02216	0.7100
B	10	0.7080	0.07729	0.02444	0.7000
C	10	0.7280	0.06941	0.02195	0.7200

95% Confidence Interval

Group	Minimum	Maximum	From	To
A	0.6100	0.8400	0.6729	0.7731
B	0.5900	0.8300	0.6527	0.7633
C	0.6400	0.8800	0.6784	0.7776

3.2. Grupo Controle 3 horas – triplicatas A, B e C

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

**The P value is 0.9656, considered not significant.**

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

Post tests

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

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

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

Bartlett statistic (corrected) = 0.1003

The P value is 0.9511.

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

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

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

Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
A	0.1197	>0.10	Yes
B	0.1333	>0.10	Yes
C	0.1754	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	2	0.0002600	0.0001300
Residuals (within columns)	27	0.1003	0.003713
Total	29	0.1005	

F = 0.03501 = (MStreatment/MSresidual)

Summary of Data

Group	Number of Points	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
A	10	0.8390	0.06454	0.8450
B	10	0.8320	0.05996	0.8350
C	10	0.8370	0.05813	0.8450

Group	95% Confidence Interval			
	Minimum	Maximum	From	To
A	0.7400	0.9300	0.7928	0.8852
B	0.7300	0.9100	0.7891	0.8749
C	0.7600	0.9200	0.7954	0.8786

3.3. Resultados obtidos em triplicatas nas dosagens de TBARS em amostras de intestino de ratos – Grupo Controle Simulação – triplicatas A, B e C

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

**The P value is 0.8380, considered not significant.**

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

Post tests



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

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

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

Bartlett statistic (corrected) = 0.03156

The P value is 0.9843.

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

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

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

Group	KS	P Value	Passed normality test?
A	0.1918	>0.10	Yes
B	0.2043	>0.10	Yes
C	0.1692	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	2	0.001140	0.0005700
Residuals (within columns)	27	0.08649	0.003203

Total 29 0.08763  
 $F = 0.1779 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$

Summary of Data

Group	Number of Points	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
A	10	0.3850	0.05462	0.3900
B	10	0.3760	0.05777	0.3800
C	10	0.3700	0.05735	0.3600

Group	95% Confidence Interval			
	Minimum	Maximum	From	To
A	0.2800	0.4400	0.3459	0.4241
B	0.2900	0.4600	0.3347	0.4173
C	0.2600	0.4500	0.3290	0.4110

3.4. Grupo Alopurinol 2 h – triplicatas A, B e C

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

**The P value is 0.7918, considered not significant.**

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

Post tests

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

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

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

Bartlett statistic (corrected) = 0.5275

The P value is 0.7682.

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

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

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

Group	KS	P Value	Passed normality test?
A	0.3052	>0.10	Yes
B	0.1605	>0.10	Yes
C	0.1061	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	2	0.0007267	0.0003633
Residuals (within columns)	27	0.04166	0.001543

Total 29 0.04239  
 $F = 0.2355 = (MS_{\text{treatment}} / MS_{\text{residual}})$

Summary of Data

Group	Number of Points	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median	
A	10	0.3790	0.04122	0.01303	0.3900
B	10	0.3720	0.03360	0.01062	0.3750
C	10	0.3670	0.04244	0.01342	0.3650

Group	Minimum	Maximum	From	To
A	0.2800	0.4200	0.3495	0.4085
B	0.3000	0.4200	0.3480	0.3960
C	0.2900	0.4300	0.3366	0.3974

3.5. Grupo Alopurinol 3 h – triplicatas A, B e C

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

**The P value is 0.7331, considered not significant.**

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

Post tests

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

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

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

Bartlett statistic (corrected) = 0.6282

The P value is 0.7305.

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

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

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

Group	KS	P Value	Passed normality test?
A	0.2137	>0.10	Yes
B	0.1814	>0.10	Yes
C	0.1827	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	2	0.001327	0.0006633
Residuals (within columns)	27	0.05702	0.002112

Total 29 0.05835  
 $F = 0.3141 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$

Summary of Data

Group	Number of Points	Standard Mean	Standard Deviation	Error of Mean	Median
A	10	0.3820	0.04962	0.01569	0.3950
B	10	0.3970	0.04877	0.01542	0.4050
C	10	0.3950	0.03866	0.01222	0.4050

95% Confidence Interval

Group	Minimum	Maximum	From	To
A	0.2700	0.4300	0.3465	0.4175
B	0.2900	0.4500	0.3621	0.4319
C	0.3100	0.4300	0.3673	0.4227

### 3.6. Grupo Alopurinol-Simulação– triplicatas A, B e C

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

**The P value is 0.9892, considered not significant.**

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

Post tests

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

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

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

Bartlett statistic (corrected) = 0.04981

The P value is 0.9754.

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

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow



Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
A	0.1925	>0.10	Yes
B	0.2394	>0.10	Yes
C	0.1665	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	2	4.667E-05	2.333E-05
Residuals (within columns)	27	0.05797	0.002147
Total	29	0.05802	

F = 0.01087 = (MStreatment/MSresidual)

Summary of Data

Group	Number of Points	Standard Mean	Standard Deviation	Error of Mean	Median
A	10	0.3770	0.04572	0.01446	0.3900
B	10	0.3800	0.04830	0.01528	0.3850
C	10	0.3780	0.04492	0.01420	0.3800

95% Confidence Interval

Group	Minimum	Maximum	From	To
A	0.2800	0.4400	0.3443	0.4097
B	0.2700	0.4600	0.3454	0.4146
C	0.2800	0.4500	0.3459	0.4101

## ANEXO 4 - RESULTADOS OBTIDOS NAS DOSAGENS DE ENDOTOXINAS

TABELA 17 – RESULTADOS OBTIDOS NAS DOSAGENS DE ENDOTOXINAS

Ratos	Controles						Alopurinol					
	C-2h		C-3h		C-S		A-2h		A-3h		A-S	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
1	0,039	0,039	0,156	0,156	ND	ND	0,039	0,039	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	0,039	0,039	ND	ND	ND	ND	0,039	0,039	ND	ND
3	ND	ND	0,156	0,156	ND	ND	ND	ND	0,078	0,078	ND	ND
4	0,039	0,039	0,156	0,156	ND	ND	ND	ND	0,039	0,039	ND	ND
5	0,039	0,039	0,039	0,039	ND	ND	0,039	0,039	ND	ND	ND	ND
6	ND	ND	0,156	0,156	ND	ND	0,039	0,039	ND	ND	ND	ND
7	0,156	0,156	0,156	0,156	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	0,156	0,156	0,078	0,078	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	ND	ND	0,078	0,078	ND	ND	ND	ND	0,039	0,039	ND	ND
10	ND	ND	0,078	0,078	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Média	<b>0,0429</b>		<b>0,1092</b>		Não se aplica		<b>0,0117</b>		<b>0,0195</b>		Não se aplica	
Desvio padrão	<b>0,0622</b>		<b>0,0513</b>				<b>0,0188</b>		<b>0,0275</b>			

Legenda:

ND = não detectável ( para efeito de cálculos estatísticos ND=0)

## ANEXO 5 - RELATÓRIOS ESTATÍSTICOS DAS COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DAS DOSAGENS DE ENDOTOXINA ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ALOPURINOL

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

**The P value is < 0.0001, considered extremely significant.**

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.184 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
<b>C-2h vs C-3h</b>	<b>-0.06630</b>	<b>5.882</b>	<b>** P&lt;0.01</b>
<b>C-2h vs C-S</b>	<b>0.04290</b>	<b>3.806</b>	<b>ns P&gt;0.05</b>
<b>C-2h vs A-2h</b>	<b>0.03120</b>	<b>2.768</b>	<b>ns P&gt;0.05</b>
<b>C-2h vs A-3h</b>	<b>0.02340</b>	<b>2.076</b>	<b>ns P&gt;0.05</b>
<b>C-2h vs A-S</b>	<b>0.04290</b>	<b>3.806</b>	<b>ns P&gt;0.05</b>
<b>C-3h vs C-S</b>	<b>0.1092</b>	<b>9.689</b>	<b>*** P&lt;0.001</b>
<b>C-3h vs A-2h</b>	<b>0.09750</b>	<b>8.651</b>	<b>*** P&lt;0.001</b>
<b>C-3h vs A-3h</b>	<b>0.08970</b>	<b>7.959</b>	<b>*** P&lt;0.001</b>
<b>C-3h vs A-S</b>	<b>0.1092</b>	<b>9.689</b>	<b>*** P&lt;0.001</b>
<b>C-S vs A-2h</b>	<b>-0.01170</b>	<b>1.038</b>	<b>ns P&gt;0.05</b>
<b>C-S vs A-3h</b>	<b>-0.01950</b>	<b>1.730</b>	<b>ns P&gt;0.05</b>
<b>C-S vs A-S</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>ns P&gt;0.05</b>
<b>A-2h vs A-3h</b>	<b>-0.007800</b>	<b>0.6921</b>	<b>ns P&gt;0.05</b>
<b>A-2h vs A-S</b>	<b>0.01170</b>	<b>1.038</b>	<b>ns P&gt;0.05</b>
<b>A-3h vs A-S</b>	<b>0.01950</b>	<b>1.730</b>	<b>ns P&gt;0.05</b>

Difference	Mean Difference	95% Confidence Interval From	To
C-2h - C-3h	-0.06630	-0.1135	-0.01915
C-2h - C-S	0.04290	-0.0042540	0.09005
C-2h - A-2h	0.03120	-0.015950	0.07835
C-2h - A-3h	0.02340	-0.023750	0.07055
C-2h - A-S	0.04290	-0.0042540	0.09005
C-3h - C-S	0.1092	0.06205	0.1564
C-3h - A-2h	0.09750	0.05035	0.1447
C-3h - A-3h	0.08970	0.04255	0.1369
C-3h - A-S	0.1092	0.06205	0.1564
C-S - A-2h	-0.01170	-0.058850	0.03545
C-S - A-3h	-0.01950	-0.066650	0.02765
C-S - A-S	0.000	-0.047150	0.04715
A-2h - A-3h	-0.007800	-0.054950	0.03935
A-2h - A-S	0.01170	-0.035450	0.05885
A-3h - A-S	0.01950	-0.027650	0.06665

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

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

Bartlett's test cannot be performed because at least one column's standard deviation is zero.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

ANOVA assumes that the data are sampled from populations that follow



Gaussian distributions. This assumption is tested using the method Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
C-2h	0.3250	>0.10	Yes
C-3h	0.3190	>0.10	Yes
C-S	>0.10		No
A-2h	0.4327	0.0473	No
A-3h	0.3602	>0.10	Yes
A-S	>0.10		No

At least one column failed the normality test with  $P < 0.05$ . Consider using a nonparametric test or transforming the data (i.e. converting to logarithms or reciprocals).

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	5	0.08682	0.01736
Residuals (within columns)	54	0.06860	0.001270

Total 59 0.1554  
 $F = 13.670 = (MS_{\text{treatment}} / MS_{\text{residual}})$

Summary of Data

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
C-2h	10	0.04290	0.06221	0.01967	0.01950
C-3h	10	0.1092	0.05135	0.01624	0.1170
C-S	10	0.000	0.000	0.000	0.000
A-2h	10	0.01170	0.01884	0.005957	0.000
A-3h	10	0.01950	0.02758	0.008721	0.000
A-S	10	0.000	0.000	0.000	0.000

95% Confidence Interval

Group	Minimum	Maximum	From	To
C-2h	0.000	0.1560	-0.001599	0.08740
C-3h	0.03900	0.1560	0.07247	0.1459
C-S	0.000	0.000	0.000	0.000
A-2h	0.000	0.03900	-0.001776	0.02518
A-3h	0.000	0.07800	-0.0002261	0.03923
A-S	0.000	0.000	0.000	0.000

**ANEXO 6 - RESULTADOS OBTIDOS EM TRIPLICATAS NAS DOSAGENS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM AMOSTRAS DO GRUPO CONTROLE**

**TABELA 18 – RESULTADOS OBTIDOS EM TRIPLICATAS NAS DOSAGENS DO FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM AMOSTRAS DO GRUPO CONTROLE**

Ratos	C-2h			C-3h			C-S		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
<b>1</b>	153	163	174	650	648	636	33	32	34
<b>2</b>	216	226	219	716	723	715	36	37	35
<b>3</b>	387	374	381	733	748	698	48	45	43
<b>4</b>	475	482	482	830	841	795	25	28	31
<b>5</b>	376	378	366	623	633	626	43	41	42
<b>6</b>	418	422	414	725	719	715	38	36	33
<b>7</b>	416	418	422	901	816	809	32	29	32
<b>8</b>	435	422	419	775	762	754	41	39	42
<b>9</b>	221	232	229	682	683	656	43	44	46
<b>10</b>	374	361	359	986	979	912	34	33	34
<b>p</b>	<b>0,9154</b>			<b>0,7851</b>			<b>0,9357</b>		
<b>Média</b>	<b>347,4</b>	<b>348,1</b>	<b>346,7</b>	<b>692,9</b>	<b>686,7</b>	<b>665,4</b>	<b>34,0</b>	<b>33,3</b>	<b>34,1</b>
<b>Desvio padrão</b>	<b>109,5</b>	<b>104,4</b>	<b>103,0</b>	<b>253,7</b>	<b>247,2</b>	<b>235,2</b>	<b>12,7</b>	<b>11,8</b>	<b>11,5</b>

## ANEXO 7 - RELATÓRIOS ESTATÍSTICOS DAS VALIDAÇÕES PROCEDIDAS ENTRE OS RESULTADOS DAS DOSAGENS DE TNF $\alpha$ EM TRIPLICATAS DO GRUPO CONTROLE

### 7.7. Grupo Controle 2 h – triplicatas A, B e C

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

**The P value is 0.9996, considered not significant.**

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

Post tests

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

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

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

Bartlett statistic (corrected) = 0.03522

The P value is 0.9825.

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

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

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

Group	KS	P Value	Passed normality test?
A	0.2971	>0.10	Yes
B	0.2503	>0.10	Yes
C	0.2483	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	2	8.467	4.233
Residuals (within columns)	27	301309	11160

Total 29 301317  
F = 0.0003793 =(MStreatment/MSresidual)

Summary of Data

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
A	10	347.10	109.43	34.605	381.50
B	10	347.80	104.41	33.018	376.00
C	10	346.50	102.97	32.561	373.50

95% Confidence Interval

Group	Minimum	Maximum	From	To
A	153.00	475.00	268.82	425.38
B	163.00	482.00	273.11	422.49
C	174.00	482.00	272.85	420.15



7.8. Grupo Controle 3 h – triplicatas A, B e C

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

**The P value is 0.7851, considered not significant.**

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

Post tests

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

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

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

Bartlett statistic (corrected) = 0.5356

The P value is 0.7651.

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

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

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

Group	KS	P Value	Passed normality test?
A	0.2008	>0.10	Yes
B	0.1736	>0.10	Yes
C	0.1743	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	2	5116.1	2558.0
Residuals (within columns)	27	282851	10476

Total 29 287967  
 $F = 0.2442 = (MS_{treatment} / MS_{residual})$

Summary of Data

Group	Points	Mean	Deviation	Standard Error of Mean	Median
A	10	762.10	113.96	36.037	729.00
B	10	755.20	102.86	32.528	735.50
C	10	731.60	88.658	28.036	715.00

95% Confidence Interval

Group	Minimum	Maximum	From	To
A	623.00	986.00	680.58	843.62
B	633.00	979.00	681.62	828.78
C	626.00	912.00	668.18	795.02

7.8. Grupo Controle-Simulação- triplicatas A, B e C

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

**The P value is 0.9357, considered not significant.**

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

Post tests

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

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

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

Bartlett statistic (corrected) = 0.3840

The P value is 0.8253.

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

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

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

Group	KS	P Value	Passed normality test?
A	0.1145	>0.10	Yes
B	0.1168	>0.10	Yes
C	0.2572	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	2	4.867	2.433
Residuals (within columns)	27	986.10	36.522

Total 29 990.97  
 $F = 0.06663 = (MS_{\text{treatment}} / MS_{\text{residual}})$

Summary of Data

Group	Number of	Points	Mean	Standard Deviation	Mean	Median
A	10	37.300	6.701	2.119	37.000	
B	10	36.400	5.929	1.875	36.500	
C	10	37.200	5.432	1.718	34.500	
95% Confidence Interval						
Group	Minimum	Maximum	From	To		
A	25.000	48.000	32.507	42.093		
B	28.000	45.000	32.159	40.641		
C	31.000	46.000	33.314	41.086		

**ANEXO 8 - RELATÓRIOS ESTATÍSTICOS DAS VALIDAÇÕES PROCEDIDAS  
ENTRE OS RESULTADOS DAS DOSAGENS DE TNF $\alpha$  EM  
TRIPLICATAS DO GRUPO ALOPURINOL**

TABELA 19 – RESULTADOS OBTIDOS EM TRIPLICATAS NAS DOSAGENS DO FATOR DE  
NECROSE TUMORAL ALFA EM AMOSTRAS DO GRUPO ALOPURINOL

Ratos	A-2h			A-3h			A-S		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	36	36	37	175	178	184	28	23	27
2	47	49	52	213	226	237	36	39	36
3	28	29	33	247	264	276	23	28	29
4	12	15	15	362	351	358	31	34	32
5	43	44	44	153	163	174	20	22	26
6	38	39	37	361	370	296	38	37	35
7	35	36	34	478	489	445	32	33	34
8	27	28	31	334	344	347	44	43	44
9	28	29	32	207	214	286	41	39	41
10	35	37	36	226	231	231	39	38	37
p	<b>0,8762</b>			<b>0,9797</b>			<b>0,9592</b>		
Média	<b>32,9</b>	<b>34,2</b>	<b>35,1</b>	<b>275,6</b>	<b>283</b>	<b>283,4</b>	<b>33,2</b>	<b>33,6</b>	<b>34,1</b>
Desvio padrão	<b>9,8</b>	<b>9,5</b>	<b>9,5</b>	<b>103,4</b>	<b>102,7</b>	<b>83,5</b>	<b>7,8</b>	<b>7,1</b>	<b>5,8</b>

8.1. Grupo Alopurinol 2h – triplicatas A, B e C

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.8762, considered not significant.

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

Post tests

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

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

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

Bartlett statistic (corrected) = 0.01188

The P value is 0.9941.

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

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

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

Group	KS	P Value	Passed normality test?
A	0.1848	>0.10	Yes
B	0.1751	>0.10	Yes
C	0.2327	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of	Degrees of	Sum of	Mean
-----------	------------	--------	------



variation	freedom	squares	square
Treatments (between columns)	2	24.467	12.233
Residuals (within columns)	27	2487.4	92.126
Total	29	2511.9	

F = 0.1328 =(MStreatment/MSresidual)

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Mean	Median
A	10	32.900	9.803	3.100	35.000
B	10	34.200	9.508	3.007	36.000
C	10	35.100	9.480	2.998	35.000

95% Confidence Interval

Group	Minimum	Maximum	From	To
A	12.000	47.000	25.888	39.912
B	15.000	49.000	27.399	41.001
C	15.000	52.000	28.319	41.881

8.2. Grupo Alopurinol 3h – triplicatas A, B e C

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.8762, considered not significant.

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

Post tests

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

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

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

Bartlett statistic (corrected) = 0.01188

The P value is 0.9941.

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

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

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

Group	KS	P Value	Passed normality test?
A	0.1848	>0.10	Yes
B	0.1751	>0.10	Yes
C	0.2327	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	2	24.467	12.233
Residuals (within columns)	27	2487.4	92.126

Total 29 2511.9  
 $F = 0.1328 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$

Summary of Data

Group	Points	Mean	Standard Deviation	Mean	Median
A	10	32.900	9.803	3.100	35.000
B	10	34.200	9.508	3.007	36.000
C	10	35.100	9.480	2.998	35.000

95% Confidence Interval

Group	Minimum	Maximum	From	To
A	12.000	47.000	25.888	39.912
B	15.000	49.000	27.399	41.001
C	15.000	52.000	28.319	41.881

8.3. Grupo Alopurinol-Simulação – triplicatas A, B e C

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is 0.9592, considered not significant.

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

Post tests

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

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

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

Bartlett statistic (corrected) = 0.7626

The P value is 0.6830.

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

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

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

Kolmogorov and Smirnov:

Group	KS	P Value	Passed normality test?
A	0.1395	>0.10	Yes
B	0.1835	>0.10	Yes
C	0.1095	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	2	4.067	2.033
Residuals (within columns)	27	1314.9	48.700

Total 29 1319.0  
 $F = 0.04175 = (MStreatment/MSresidual)$

Summary of Data

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Mean	Median
A	10	33.200	7.843	2.480	34.000
B	10	33.600	7.121	2.252	35.500
C	10	34.100	5.820	1.841	34.500

95% Confidence Interval

Group	Minimum	Maximum	From	To
A	20.000	44.000	27.590	38.810
B	22.000	43.000	28.506	38.694
C	26.000	44.000	29.937	38.263



## ANEXO 9 - RELATÓRIOS ESTATÍSTICOS DAS COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE TODAS AS DOSAGENS DE TBARS ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ALOPURINOL

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.087 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean		q	P value
	Difference			
<b>C 2h vs C 3h</b>	<b>-0.1163</b>		<b>12.002 ***</b>	<b>P&lt;0.001</b>
<b>C 2h vs CS</b>	<b>0.3427</b>		<b>35.354 ***</b>	<b>P&lt;0.001</b>
<b>C 2h vs A 2h</b>	<b>0.3470</b>		<b>35.801 ***</b>	<b>P&lt;0.001</b>
<b>C 2h vs A 3h</b>	<b>0.3283</b>		<b>33.875 ***</b>	<b>P&lt;0.001</b>
<b>C 2h vs AS</b>	<b>0.3413</b>		<b>35.216 ***</b>	<b>P&lt;0.001</b>
<b>C 3h vs CS</b>	<b>0.4590</b>		<b>47.356 ***</b>	<b>P&lt;0.001</b>
<b>C 3h vs A 2h</b>	<b>0.4633</b>		<b>47.803 ***</b>	<b>P&lt;0.001</b>
<b>C 3h vs A 3h</b>	<b>0.4447</b>		<b>45.877 ***</b>	<b>P&lt;0.001</b>
<b>C 3h vs AS</b>	<b>0.4577</b>		<b>47.218 ***</b>	<b>P&lt;0.001</b>
<b>CS vs A 2h</b>	<b>0.004333</b>		<b>0.4471 ns</b>	<b>P&gt;0.05</b>
<b>CS vs A 3h</b>	<b>-0.01433</b>		<b>1.479 ns</b>	<b>P&gt;0.05</b>
<b>CS vs AS</b>	<b>-0.001333</b>		<b>0.1376 ns</b>	<b>P&gt;0.05</b>
<b>A 2h vs A 3h</b>	<b>-0.01867</b>		<b>1.926 ns</b>	<b>P&gt;0.05</b>
<b>A 2h vs AS</b>	<b>-0.005667</b>		<b>0.5846 ns</b>	<b>P&gt;0.05</b>
<b>A 3h vs AS</b>	<b>0.01300</b>		<b>1.341 ns</b>	<b>P&gt;0.05</b>

Difference	Mean 95% Confidence Interval	
	Difference	From To
C 2h - C 3h	-0.1163	-0.1559 -0.07672
C 2h - CS	0.3427	0.3031 0.3823
C 2h - A 2h	0.3470	0.3074 0.3866
C 2h - A 3h	0.3283	0.2887 0.3679
C 2h - AS	0.3413	0.3017 0.3809
C 3h - CS	0.4590	0.4194 0.4986
C 3h - A 2h	0.4633	0.4237 0.5029
C 3h - A 3h	0.4447	0.4051 0.4843
C 3h - AS	0.4577	0.4181 0.4973
CS - A 2h	0.004333	-0.035280.04394
CS - A 3h	-0.01433	-0.053940.02528
CS - AS	-0.001333	-0.040940.03828
A 2h - A 3h	-0.01867	-0.058280.02094
A 2h - AS	-0.005667	-0.045280.03394
A 3h - AS	0.01300	-0.026610.05261

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

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

Bartlett statistic (corrected) = 14.221

The P value is 0.0143.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is significant.

Since ANOVA assumes populations with equal SDs, you should consider transforming your data (reciprocal or log) or selecting a nonparametric test.

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

Group	KS	P Value	Passed normality test?
C 2h	0.1416	>0.10	Yes
C 3h	0.1292	>0.10	Yes
CS	0.1119	>0.10	Yes
A 2h	0.1415	>0.10	Yes
A 3h	0.1669	>0.10	Yes
AS	0.1632	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	5	6.545	1.309
Residuals (within columns)	174	0.4904	0.002818
Total	179	7.035	

F = 464.45 = (MS<sub>treatment</sub>/MS<sub>residual</sub>)

**Summary of Data**

Group	Number of Points	Mean	Standard Deviation	Standard Error of Mean	Median
C 2h	30	0.7197	0.07034	0.01284	0.7100
C 3h	30	0.8360	0.05887	0.01075	0.8400
CS	30	0.3770	0.05497	0.01004	0.3800
A 2h	30	0.3727	0.03823	0.006980	0.3800
A 3h	30	0.3913	0.04485	0.008189	0.4050
AS	30	0.3783	0.04473	0.008166	0.3800

95% Confidence Interval

Group	Minimum	Maximum	From	To
C 2h	0.5900	0.8800	0.6934	0.7459
C 3h	0.7300	0.9300	0.8140	0.8580
CS	0.2600	0.4600	0.3565	0.3975
A 2h	0.2800	0.4300	0.3584	0.3869
A 3h	0.2700	0.4500	0.3746	0.4081
AS	0.2700	0.4600	0.3616	0.3950

## ANEXO 10 - RELATÓRIOS ESTATÍSTICOS DAS COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DE TODAS AS DOSAGENS DE TNF $\alpha$ ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ALOPURINOL

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

**The P value is < 0.0001, considered extremely significant.**

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.087 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean Difference	q	P value
<b>C 2h vs C 3h</b>	<b>-402.50</b>	<b>31.597</b>	<b>*** P&lt;0.001</b>
<b>C 2h vs CS</b>	<b>310.17</b>	<b>24.349</b>	<b>*** P&lt;0.001</b>
<b>C 2h vs A 2h</b>	<b>313.50</b>	<b>24.611</b>	<b>*** P&lt;0.001</b>
C 2h vs A3h	66.467	5.218	** P<0.01
C 2h vs AS	313.50	24.611	*** P<0.001
<b>C 3h vs CS</b>	<b>712.67</b>	<b>55.946</b>	<b>*** P&lt;0.001</b>
C 3h vs A 2h	716.00	56.208	*** P<0.001
C 3h vs A3h	468.97	36.815	*** P<0.001
C 3h vs AS	716.00	56.208	*** P<0.001
CS vs A 2h	3.333	0.2617	ns P>0.05
CS vs A3h	-243.70	19.131	*** P<0.001
<b>CS vs AS</b>	<b>3.333</b>	<b>0.2617</b>	<b>ns P&gt;0.05</b>
<b>A 2h vs A3h</b>	<b>-247.03</b>	<b>19.393</b>	<b>*** P&lt;0.001</b>
<b>A 2h vs AS</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>ns P&gt;0.05</b>
<b>A3h vs AS</b>	<b>247.03</b>	<b>19.393</b>	<b>*** P&lt;0.001</b>

Mean    95% Confidence Interval

Difference	Difference From	To
C 2h - C 3h	-402.50	-454.56 -350.44
C 2h - CS	310.17	258.11 362.22
C 2h - A 2h	313.50	261.44 365.56
C 2h - A3h	66.467	14.410 118.52
C 2h - AS	313.50	261.44 365.56
C 3h - CS	712.67	660.61 764.72
C 3h - A 2h	716.00	663.94 768.06
C 3h - A3h	468.97	416.91 521.02
C 3h - AS	716.00	663.94 768.06
CS - A 2h	3.333	-48.724 55.390
CS - A3h	-243.70	-295.76 -191.64
CS - AS	3.333	-48.724 55.390
A 2h - A3h	-247.03	-299.09 -194.98
A 2h - AS	0.000	-52.057 52.057
A3h - AS	247.03	194.98 299.09

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

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

Bartlett statistic (corrected) = 350.45

The P value is < 0.0001.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is extremely significant.

Since ANOVA assumes populations with equal SDs, you should consider transforming your data (reciprocal or log) or selecting a nonparametric test.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?



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

Group	KS	P Value	Passed normality test?
C 2h	0.2463	0.0525	Yes
C 3h	0.1329	>0.10	Yes
CS	0.1274	>0.10	Yes
A 2h	0.1038	>0.10	Yes
A3h	0.1462	>0.10	Yes
AS	0.1038	>0.10	Yes

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	5	1.196E+07	2393790
Residuals (within columns)	174	847030	4868.0

Total 179 1.281E+07

F = 491.74 =(MStreatment/MSresidual)

Summary of Data

Group	Points	Mean	Deviation	Mean	Median
C 2h	30	347.13	101.93	18.610	377.00
C 3h	30	749.63	99.649	18.193	724.00
CS	30	36.967	5.846	1.067	36.000
A 2h	30	33.633	6.744	1.231	34.500
A3h	30	280.67	93.609	17.091	255.50
AS	30	33.633	6.744	1.231	34.500

95% Confidence Interval

Group	Minimum	Maximum	From	To
C 2h	153.00	482.00	309.08	385.19
C 3h	623.00	986.00	712.43	786.84
CS	25.000	48.000	34.784	39.149
A 2h	20.000	44.000	31.115	36.151
A3h	153.00	489.00	245.72	315.62
AS	20.000	44.000	31.115	36.151

**ANEXO 11 - RESULTADOS OBTIDOS EM TRIPLICATAS NAS PESQUISAS DE BACTÉRIAS INDICADORAS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA INDICADA PELO NÚMERO DE ISOLAMENTOS OBTIDOS EM CADA TESTE**

**TABELA 20 – RESULTADOS OBTIDOS EM TRIPLICATAS NAS PESQUISAS DE BACTÉRIAS INDICADORAS DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA INDICADA PELO NÚMERO DE ISOLAMENTOS OBTIDOS EM CADA TESTE**

Ratos	Controles									Alopurinol								
	C-2h			C-3h			C-S			A-2h			A-3h			A-S		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
1	1	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	1	3	3	3	1	1	1
2	1	1	1	4	4	4	0	0	0	1	1	1	3	3	3	0	0	0
3	1	1	1	4	4	4	0	0	0	1	1	1	2	2	2	0	0	0
4	1	1	1	3	3	3	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
5	0	0	0	3	3	3	0	0	0	0	0	0	2	2	2	0	0	0
6	1	1	1	3	3	3	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0
7	0	0	0	3	3	3	0	0	0	0	0	0	4	4	4	0	0	0
8	1	1	1	3	3	3	0	0	0	1	1	1	3	3	3	0	0	0
9	1	1	1	3	3	3	0	0	0	1	1	1	3	3	3	0	0	0
10	1	1	1	2	2	2	0	0	0	1	1	1	2	2	2	0	0	0
<b>Média</b>	<b>0,8</b>			<b>3</b>			<b>0,1</b>			<b>0,7</b>			<b>2,4</b>			<b>0,1</b>		
<b>Desvio padrão</b>	<b>0,42</b>			<b>0,67</b>			<b>0,32</b>			<b>0,48</b>			<b>0,97</b>			<b>0,32</b>		

## ANEXO 12 - RELATÓRIOS ESTATÍSTICOS DAS COMPARAÇÕES ENTRE OS RESULTADOS DAS AVALIAÇÕES DE TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA ENTRE OS GRUPOS CONTROLE E ALOPURINOL

One-way Analysis of Variance (ANOVA)

The P value is < 0.0001, considered extremely significant.

Variation among column means is significantly greater than expected by chance.

Tukey-Kramer Multiple Comparisons Test

If the value of q is greater than 4.184 then the P value is less than 0.05.

Comparison	Mean		q	P value
	Difference			
<b>C-2h vs C-3h</b>	<b>-2.200</b>	<b>12.084</b>	<b>***</b>	<b>P&lt;0.001</b>
<b>C-2h vs C-S</b>	<b>0.7000</b>	<b>3.845</b>	<b>ns</b>	<b>P&gt;0.05</b>
<b>C-2h vs A-2h</b>	<b>0.1000</b>	<b>0.5493</b>	<b>ns</b>	<b>P&gt;0.05</b>
<b>C-2h vs A-3h</b>	<b>-1.600</b>	<b>8.788</b>	<b>***</b>	<b>P&lt;0.001</b>
<b>C-2h vs A-S</b>	<b>0.7000</b>	<b>3.845</b>	<b>ns</b>	<b>P&gt;0.05</b>
<b>C-3h vs C-S</b>	<b>2.900</b>	<b>15.928</b>	<b>***</b>	<b>P&lt;0.001</b>
<b>C-3h vs A-2h</b>	<b>2.300</b>	<b>12.633</b>	<b>***</b>	<b>P&lt;0.001</b>
<b>C-3h vs A-3h</b>	<b>0.6000</b>	<b>3.296</b>	<b>ns</b>	<b>P&gt;0.05</b>
<b>C-3h vs A-S</b>	<b>2.900</b>	<b>15.928</b>	<b>***</b>	<b>P&lt;0.001</b>
<b>C-S vs A-2h</b>	<b>-0.6000</b>	<b>3.296</b>	<b>ns</b>	<b>P&gt;0.05</b>
<b>C-S vs A-3h</b>	<b>-2.300</b>	<b>12.633</b>	<b>***</b>	<b>P&lt;0.001</b>
<b>C-S vs A-S</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>ns</b>	<b>P&gt;0.05</b>
<b>A-2h vs A-3h</b>	<b>-1.700</b>	<b>9.337</b>	<b>***</b>	<b>P&lt;0.001</b>
<b>A-2h vs A-S</b>	<b>0.6000</b>	<b>3.296</b>	<b>ns</b>	<b>P&gt;0.05</b>
<b>A-3h vs A-S</b>	<b>2.300</b>	<b>12.633</b>	<b>***</b>	<b>P&lt;0.001</b>

Difference	Mean	95% Confidence Interval	
	Difference	From	To
C-2h - C-3h	-2.200	-2.962	-1.438
C-2h - C-S	0.7000	-0.06171	1.462
C-2h - A-2h	0.1000	-0.6617	0.8617
C-2h - A-3h	-1.600	-2.362	-0.8383
C-2h - A-S	0.7000	-0.06171	1.462
C-3h - C-S	2.900	2.138	3.662
C-3h - A-2h	2.300	1.538	3.062
C-3h - A-3h	0.6000	-0.1617	1.362
C-3h - A-S	2.900	2.138	3.662
C-S - A-2h	-0.6000	-1.362	0.1617
C-S - A-3h	-2.300	-3.062	-1.538
C-S - A-S	0.000	-0.7617	0.7617
A-2h - A-3h	-1.700	-2.462	-0.9383
A-2h - A-S	0.6000	-0.1617	1.362
A-3h - A-S	2.300	1.538	3.062

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

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

Bartlett statistic (corrected) = 17.621

The P value is 0.0035.

Bartlett's test suggests that the differences among the SDs is very significant.

Since ANOVA assumes populations with equal SDs, you should consider transforming your data (reciprocal or log) or selecting a



nonparametric test.

Assumption test: Are the data sampled from Gaussian distributions?

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

Group	KS	P Value	Passed normality test?
C-2h	0.4824	0.0191	No
C-3h	0.3000	>0.10	Yes
C-S	0.5241	0.0082	No
A-2h	0.4327	0.0473	No
A-3h	0.2327	>0.10	Yes
A-S	0.5241	0.0082	No

At least one column failed the normality test with  $P < 0.05$ .

Consider using a nonparametric test or transforming the data (i.e. converting to logarithms or reciprocals).

Intermediate calculations. ANOVA table

Source of variation	Degrees of freedom	Sum of squares	Mean square
Treatments (between columns)	5	75.083	15.017
Residuals (within columns)	54	17.900	0.3315
Total	59	92.983	

$F = 45.302 = (MS_{\text{treatment}}/MS_{\text{residual}})$

Summary of Data

Group	Number of Points	Standard Error of			
		Mean	Deviation	Mean	Median
C-2h	10	0.8000	0.4216	0.1333	1.000
C-3h	10	3.000	0.6667	0.2108	3.000
C-S	10	0.1000	0.3162	0.1000	0.000
A-2h	10	0.7000	0.4830	0.1528	1.000
A-3h	10	2.400	0.9661	0.3055	2.500
A-S	10	0.1000	0.3162	0.1000	0.000

Group	95% Confidence Interval			
	Minimum	Maximum	From	To
C-2h	0.000	1.000	0.4984	1.102
C-3h	2.000	4.000	2.523	3.477
C-S	0.000	1.000	-0.1262	0.3262
A-2h	0.000	1.000	0.3545	1.046
A-3h	1.000	4.000	1.709	3.091
A-S	0.000	1.000	-0.1262	0.3262