**MONICA MENEZES MATTE**

# REPERCUSSÕES TECIDUAIS PULMONARES EM DIFERENTES MODELOS DE SEPSE EM RATOS

**Curitiba**

**2011**

**MONICA MENEZES MATTE**

# REPERCUSSÕES TECIDUAIS PULMONARES EM DIFERENTES MODELOS DE SEPSE EM RATOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como pré-requisito para a obtenção do título de Mestre em Clínica Cirúrgica.

**Orientador: Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha**

**Curitiba**

**2011**

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Monica Menezes Matte

Repercussões teciduais pulmonares em diferentes modelos de sepse em ratos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de mestre

Aprovado em de de 2011.

Banca examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.

Chico Xavier

# DEDICATÓRIA

Dedico a minha vida e conquistas:

A JESUS, que na sua sabedoria infinita colocou-me no seio de uma família de luz e energia vital e que no meu caminho plantou seres especiais, que cuidam, enchem de ânimo e controlam o meu ser. Ele é a luz do meu viver, do meu pensar, do meu falar, do meu sentir e do meu agir. Obrigada por minha vida, por minha família, meus amigos e mestres.

A meus pais, Ivalina e Nilton, que me deram a vida, vibraram com as minhas conquistas e acreditam no meu sucesso. Obrigada por terem me apresentado ao mundo.

Aos meus pais do coração, Perina Clara e José Carlos, que sempre caminharam comigo.

Aos meus irmãos, Evando, Izaura e Guilhermina, aos meus irmãos do coração, Sonia, Beatriz e Paulo Roberto, pelo apoio incondicional.

As minhas sobrinhas e aos meus sobrinhos, que pediram pela fortificação do meu ser diante de uma caminhada árdua.

A Mario Ricardo, “AMOR”, iluminado, companheiro. Deu-me sua mão, sua vida e dedicação. É o meu sol de cada manhã, meu porto seguro, é um mistério. A cada queda sustentou-me, ergueu-me, compreendeu-me. “OBRIGADA”!

# AGRADECIMENTOS

Há tempo para tudo em nossa vida (Ecle. 3.1-8). Neste momento é tempo de agradecer:

Ao meu orientador, Dr. Sérgio Luiz Rocha, pela receptividade, credibilidade, disponibilidade, segurança e interesse na orientação durante o desenvolvimento do estudo.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), por oferecer um curso de mestrado multidisciplinar na área da saúde, propiciando aos profissionais enriquecer seus conhecimentos em uma instituição reconhecida na sociedade.

Aos professores do mestrado em Clínica Cirúrgica, pela dedicação, pontualidade, saberes dialogados e orientações, que nortearam certamente a caminhada do conhecimento.

Às secretarias do programa de pós-graduação, que sempre se mostraram acolhedoras, interessadas, prestativas, competentes e, acima de tudo, amigas. “Fabíola! A vida me foi generosa quando colocou você em meu caminho, foi como um anjo abençoado e iluminado”. Obrigada.

Aos componentes dos grupos de pesquisa que me acolheram como integrante e parceira legal de seus experimentos, pelo carinho e amizade que demonstraram para comigo, e aos amigos que somei nessa caminhada. Agradeço pelos momentos inesquecíveis de convivência que tornaram as viagens, noites em claro e ficar acordada em aula desafios agradáveis.

Ao Misael, amigo distante, que entendeu minhas angústias, auxiliou-me quando parecia tudo perdido. É brilhante, com gestos originais de um ser apaixonado pelo que faz, respeita o ser vivo. “Parabéns”.

Aos meus amigos Marlise e Marcos, a proteção e o cuidado que dispensaram para comigo nos momentos difíceis e de solidão jamais serão esquecidos.

Para a amiga, irmã do coração, Claudia, companheira e guerreira, com desejos reais de se tornar brilhante. “Muitas idas a Curitiba te esperei, mas em seu lugar um ser desconhecido, que certamente era ‘DEUS’ que você pedia para me acompanhar”.

# SUMÁRIO

RESUMO..... x
ABSTRACT..... xi
**1 INTRODUÇÃO.**.....01
1.1 HIPÓTESE.....03
1.2 OBJETIVO..... 04
**2 REVISÃO DA LITERATURA**.....05
2.1 DEFINIÇÃO DE SEPSE..... 05
2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE SEPSE.....08
2.2.1 Ligadura e punção do ceco..... 08
2.2.2 Injeção intraperitonial de bactérias..... 08
2.3 ICTERÍCIA OBSTRUTIVA EXPERIMENTAL..... 09
2.4 ESPLENECTOMIA EXPERIMENTAL.....11
2.5 ALTERAÇÕES PULMONARES EXPERIMENTAL.....12
**3 MÉTODO.**..... 14
3.1 DESCRIÇÃO DOS DADOS GERAIS..... 17
3.2 COLETA DOS PULMÕES..... 18
3.3 MONTAGEM DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS.....18
3.4 MORFOMETRIA.....20
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....21
**4 RESULTADOS**.....23
4.1 COMPARAÇÕES DOS CRUZAMENTOS DO EXPERIMENTO *Escherichia coli*, ESPLENECTOMIA E ICTERÍCIA..... 23
4.1.1 Comparações de pmn dos cruzamentos do experimento *Escherichia coli*.....23
4.1.2 Comparações das medidas do septo alveolar do experimento *Escherichia coli*.....24
4.2 COMPARAÇÕES DOS CRUZAMENTOS DO EXPERIMENTO ESPLENECTOMIA.....26
4.2.1 Comparações de pmn dos cruzamentos do experimento esplenectomia.....26
4.2.2 Comparações das medidas do septo alveolar do experimento esplenectomia..... 27
4.3 COMPARAÇÕES DOS CRUZAMENTOS DO EXPERIMENTO ESPLENECTOMIA.....29
4.3.1 Comparações de pmn dos cruzamentos do experimento icterícia.....29
4.3.2 Comparações das medidas do septo alveolar experimento icterícia.....30
**5 DISCUSSÃO**.....31
**6 CONCLUSÕES**.....36
**REFERÊNCIAS**.....37
**ANEXOS** .....42

# LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RELAÇÃO EXPERIMENTO GRUPO..... 17
TABELA 2 - LEGENDA TÉCNICA E TEMPO DE INDUÇÃO..... 18
TABELA 3 - COMPARAÇÕES DE PMN DOS $GC_1$ COM $GB_1$ E $GA_1$.....24
TABELA 4 - COMPARAÇÕES DE PMN DOS $GB_2$ E $GA_2$.....24
TABELA 5 - COMPARAÇÕES DA MEDIDA DO SEPTO ALVEOLAR DOS $GA_1$ COM GEc..... 24
TABELA 6 - COMPARAÇÕES DA MEDIDA DO SEPTO ALVEOLAR DOS $GB_1$ COM GEc E GF.....25
TABELA 7 - COMPARAÇÕES DA MEDIDA DO SEPTO ALVEOLAR DOS $GC_1$ COM $GC_2$, $GB_1$, $GB_2$, $GA_1$ E $GA_2$.....25
TABELA 8 - COMPARAÇÕES DA MEDIDA DO SEPTO ALVEOLAR DOS $GC_2$ COM $GA_2$ E $GB_2$.....26
TABELA 9 - COMPARAÇÕES DE PMN DOS GE COM GC..... 26
TABELA 10 - COMPARAÇÕES DE PMN DOS GE COM $GB_1$ E GEc.....27
TABELA 11 - COMPARAÇÕES DE PMN DOS GE COM $GA_1$ E GEc.....27
TABELA 12 - COMPARAÇÕES DA MEDIDA DO SEPTO ALVEOLAR DOS GC COM GE..... 27
TABELA 13 - COMPARAÇÕES DA MEDIDA DO SEPTO ALVEOLAR DOS GE COM GEc E $GB_1$.....28
TABELA 14 - COMPARAÇÕES DA MEDIDA DO SEPTO ALVEOLAR DOS GE COM GEc E $GA_1$.....28
TABELA 15 - COMPARAÇÕES DE PMN DOS GH COM GEc E GF..... 29
TABELA 16 - COMPARAÇÕES DE PMN DOS GEc COM GF.....29
TABELA 17 - COMPARAÇÕES DE PMN DOS $GE_C$ COM $GA_1$.....30
TABELA 18 - COMPARAÇÕES DA MEDIDA DO SEPTO ALVEOLAR DOS GH COM GEc E GF..... 30
TABELA 19 - COMPARAÇÕES DA MEDIDA DO SEPTO ALVEOLAR DOS GEc COM GF.....30

# LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografia Aspecto histológico do pulmão D rato 3A, Icterícia Obstrutiva GEc seta indicando PMN (HE 400X)..... 21

Figura 2 - Fotomicrografia pulmão D rato V Esplenectomia/LPC 360h seta indicando PMN (HE 1000X)..... 21

Figura 3 - Fotomicrografia pulmão D rato 26 Experimento GA Eschirichia coli 24h seta indicando referência da medida do septo (HE 400X)..... 21

Figura 4 - Fotomicrografia pulmão D rato 26 Experimento GA Eschirichia coli 24h seta indicando referência da medida do septo (HE 1000X).... 21

# RESUMO

**Introdução**: a sepse é a resposta sistêmica a infecção grave que atinge gravemente os pulmões e múltiplos órgãos, podendo levar à morte. **Objetivo**: avaliar a quantidade de células polimorfonucleares (PMN) e a espessura do septo alveolar em pulmões de ratos submetidos à sepse associada ou não a icterícia ou esplenectomia. **Métodos**: foram avaliados 85 pulmões direitos obtidos de três experimentos diferentes. Experimento *E.coli.*: animais submetidos à sepse por injeção intraperitonial de bactérias e eutanásia após 24h – $GA_1$ (n=8) e após 48h – $GA_2$ (n=4); animais submetidos à peritonite por ligadura e punção do ceco (LPC) e eutanásia após 24h – $GB_1$ (n=8) e após 48h – $GB_2$ (n=6); e grupo controle submetido à laparotomia e com eutanásia nos mesmos tempos dos grupos anteriores com $GC_1$ (n=4) e $GC_2$ (n=4). Experimento Esplenectomia: ratos submetidos à esplenectomia e laparotomia no 14º dia - GC (n=3) e ratos submetidos à LPC no 14º dia após esplenectomia – GE (n=23) e sacrificados após 24h. Experimento Icterícia Obstrutiva C: ratos submetidos à laparotomia e, após 10, dias sofreram relaparotomia e eutanásia com 24h - GH (n=10); ratos submetidos à ligadura do ducto biliar comum e, após 10 dias, laparotomia e sacrifício em 24h – GF (n=10); ratos submetidos à ligadura do ducto biliar comum e, após 10 dias, receberam LPC e sacrifício em 24h - $GE_c$ (n=5). Avaliaram-se a contagem de células polimorfonucleares e a espessura do septo alveolar no pulmão direito dos animais. Para análise dos achados morfométricos utilizou-se o teste estatístico de Kruskal-Wallis. **Resultados:** em relação aos PMN no pulmão ocorreu - aumento significativo no $GA_1$ e $GB_1$ em relação ao $GC_1$, aumento significativo entre GE em relação a aumento significativo de GEc e GF em relação ao GH; aumento significativo de GE em relação a GB1 e a GEc; aumento significativo de GE em relação a GA1e GEc; aumento significativo de GA1 em relação a GEc. Em relação à espessura do septo alveolar pulmonar; diminuição significativa do GEc e do GF em relação ao GB1; diminuição significativa entre GB1 e GC1; aumento significativo do GA2 em relação ao GC2; diminuição significativa do GE em relação ao GC; aumento significativo de GF para GEc; diminuição significativa de GEc para GE, mas não entre GE e GB1; diminuição significativa de GEc para GE e aumento de GA1 para GE; aumento significativo de GA1 para GEc. **Conclusões:** o infiltrado pulmonar de PMN em 24 horas foi significativamente maior em ratos submetidos à sepse por LPC associado ou não a icterícia ou esplenectomia, bem como aos animais com sepse por injeção intraperitonial de *E. coli* em relação aos controles. A sepse com 24 horas associada à remoção do baço aumentou significativamente o infiltrado pulmonar quando comparado à sepse associada à icterícia ou injeção intraperitonial de bactérias. A sepse após 24 horas de LPC, em animais com ou sem esplenectomia, provocou diminuição da espessura do septo alveolar em relação ao controle, mas sem diferença em animais com icterícia.

**Descritores:** Pulmão. Sepse. Ratos. Icterícia. Esplenectomia. Polimorfonucleares.

## ABSTRACT

**Introduction**: the pulmonary sepsis is a systemic response to severe infection, which severely reach the lungs and multiple organs and can lead to death. **Objective:** assassing the amount of polymorphonuclear cells (PMN) and the thickness of the aleolar septum in the lungs of rats submitted to sepsis associated or not to jaundice and splenectomy. **Methods:** there were assessed 85 right lungs obtained through three different experiment. Experiment *E.Coli*: animals submitted to sepsis through intraperitoneal injection of bacteria and euthanasia after 24h- $GA_1$ (n=8) and after 48h – $GA_2$ (n=4); animals submitted to peritone through cecal puncture and ligation (LPC) and euthanasia after 24h– $GB_1$ (n=8) and after 48h – $GB_2$ (n=6); and control group subimitted to laparotomy and euthanasia at the same periods of the previous groups with $GC_1$ (n=4) e $GC_2$ (n=4). Experiment splenectomy: rats submitted to splenectomy and laparotomy in the $14^{th}$ day GC (n=3) and rats submitted to LPC in the $14^{th}$ day after splenectomy – GE (n=23) and sacrificed apfter 24h. Experiment jaundice: rats submitted to laparotomy and after 10 days submitted to relaparotomy and euthanasia after 24h - GH (n=10); rats submitted to ligation of the common bile duct after 10 days laparotomy and sacrificed in 24h – GF (n=10); rats submitted to ligation of the common bile duct received LPC and sacrificed in 24h - $GE_c$ (n=5). There were assessed the count of the polymorphonuclear cells and the thickness of the alveolar septum in the righ lung of the animals. To the analysis of the morphometric finding there was uses the statistical test of Kruskal-Wallis. **Results:** related to the PMN of the lung occurred a significant increase in the $GA_1$and $GB_1$ related to $GC_1$, significant increase between GE related to GC; significant increase and GF related to GH; significant increase GE related to GB1 and the GEc; significant increase of GE related to GA1 and GEc; significant increase of GA1 related to the GEc. Regarding to the thickness of the lung alveolar septum : significant decrease of GEc and of the GF related to GB1; significant decrease between GB1 and GC1; significant increase of the GA2 related to GC2; significant decrease of the GE related to GC; significant increase of the GF to GEc; significant decrease of GEc to GE, but not among GE and GB1; significant decrease of the GEc to GE and increase of GA1 to GE; significant increase from GA1 to GEc. **Conclusions:** the lung infiltrate of PMN in 24h was significantly higher in rats submitted to sepsis through LPC associated or not to the jaundice and splenectomy as well as animals with sepsis trhough intraperitonial injection of *E.coli* related to the controls. The sepsis with 24h associated to the slpeen removal increased significantly the pulmonary infiltrate when compared to sepsis associated to jaudice or intraperitonial injection of the bacteria. The sepsis after 24h of LPC in animals with or without splenectomy caused a decrease of the thickness of the alveolar septum related to the control, but without difference in animals with jaundice.



**Key-words:** Lung. Sepsis. Rats. Jaundice. Splenectomy. Polymorphonuclears.

This document was created with Win2PDF available at http://www.win2pdf.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

M435r
2011

Matte, Monica Menezes
Repercussões teciduais pulmonares em diferentes modelos de sepse em ratos / Monica Menezes Matte ; orientador, Sérgio Luiz Rocha. – 2011.
xi, 41, [4] f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2011
Bibliografia: f. 37-41

1. Pulmões. 2. Septicemia. 3. Rato como animal de laboratório. 4. Icterícia. 5. Esplenectomia. I. Rocha, Sérgio Luiz. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. III. Título.

CDD 20. ed. – 617

# 1 INTRODUÇÃO

A sepse é a resposta sistêmica a um processo infeccioso grave instalado no organismo e apresenta consequências em virtude da síntese e ativação de uma cascata de mediadores químicos derivados das células, tendo sua fisiologia alterada no sistema vascular e tecidual. Assim, provoca progressiva disfunção dos órgãos, criando graves situações às funções renais, cardíacas, pulmonares, cerebrais e coagulação, podendo culminar na morte.[1]

Em uma nova hipótese para a patogênese da sepse, foram analisadas as definições dos termos utilizados neste estado de doença, desde a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) até a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO), passando pela sepse severa e choque séptico. Foram definidos cinco estágios para o desenvolvimento da SDMO: reação local no sítio da lesão ou da infecção, resposta sistêmica inicial, inflamação sistêmica maciça, imunossupressão excessiva e dissonância imunológica. O balanço entre as forças pró-inflamatórias e anti-inflamatórias poderia estar perdido quando a infecção, hemorragia, ou outras comorbidades são tão severas que a injúria do tecido seria suficiente para induzir SRIS e SDMO; ou em pacientes que desenvolvem SRIS ou SDMO em razão de enfermidade severa preexistente, a maioria dessas associadas a níveis anormais de citocinas.[2]

A repercussão pulmonar mais grave no estado de sepse é representada pela síndrome da angústia respiratória aguda (SARA), que é definida por critérios fisiológicos e radiográficos, segundo os quais o dano para as células e estruturas da membrana capilar alveolar difundem-se nos pulmões dentro de horas ou dias após o início do insulto.[3] A mortalidade é essencialmente maior em pessoas idosas, nas quais há aumento das condições que precipitam o desenvolvimento da SARA, tal como a sepse.[4]

A maior característica da SARA, que a distingue de outras doenças pulmonares, como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica e fibrose pulmonar idiopática, é que frequentemente tem um componente sistêmico. Dentre as causas que levam os pacientes de todas as idades a desenvolverem SARA têm-se sepse (pulmonar e não pulmonar), pneumonia (bacteriana, viral ou fúngica), aspiração

gástrica ou de conteúdo de orofaringe, grandes traumas, pancreatite aguda, entre outras.[5]

Segundo Runcie e Ramsay[6], o dano pulmonar provocado após infecção abdominal é causado por contribuições de leucócitos, plaquetas, microêmbolos, influências neurológica, sistema complemento, citocinase e radicais livres. A adesão de neutrófilos aos capilares pulmonares é importante mecanismo no dano pulmonar. Os autores referem também que o dano pulmonar pode ser limitado pela neutropenia.

Em estudo experimental em ratos com alterações hormonais e indução de sepse abdominal, D'Acampora et al. investigaram as alterações do tecido pulmonar. Observaram que ratos machos foram mais suscetíveis à mortalidade após 24 horas de peritonite em relação às fêmeas e que havia aumento de polimorfonucleares nos pulmões destes animais.[7]

Em estudo que analisou a isquemia tecidual devido à trombose microvascular generalizada como fator importante na resposta inflamatória aguda na sepse, essa seria uma resposta adaptativa a fim de prevenir a proliferação de bactérias dos tecidos para circulação sistêmica, através da rede capilar, e os leucócitos removeriam as bactérias evitando o dano tecidual. Contudo, quando a trombose microvascular se torna difusa, a isquemia tecidual é extensa e pode precipitar a falência de órgãos e levar à morte. Necropsias de pacientes que morreram de sepse demonstraram trombose microvascular nos rins, fígado, pulmões, intestino, suprarrenais e cérebro.[8]

A sepse, ao atingir de forma grave a função pulmonar, desencadeia complicações, as quais podem ser verificadas por meio de estudo experimental, pois nos pacientes com SARA a investigação por meio de biópsia pulmonar está contraindicada. Os danos aos pulmões são causados pelos produtos das bactérias, que estimulam neutrófilos, liberando citocinas e enzimas e provocando lesão na microcirculação. A utilização de ratas da linhagem Sprague-Dawley para avaliar a aplicação de substância inibidora do fator nuclear-kB em animais submetidos à sepse pela ligadura e punção do ceco auxiliou na melhora da avaliação em relação à mortalidade e ao dano pulmonar dos animais que receberem esta substância.[9]

Comprovou-se em estudo experimental que ratos submetidos à hepatectomia parcial apresentaram translocação bacteriana para os pulmões, sendo tanto maior a intensidade quanto maior o volume de ressecção do fígado, ou seja, quanto maior a agressão sofrida pelo organismo. Associou-se a translocação de bactérias do intestino como fator que poderia conduzir à infecção pulmonar após a hepatectomia em ratos.[10]

Ao realizar revisão crítica dos modelos de sepse, evidenciou-se que os estudos experimentais que utilizam o desenvolvimento de sepse geralmente usam animais de laboratório, como ratos e camundongos, reservando animais de grande porte quando há a necessidade de monitoramento de algumas funções, como se estivessem em unidade de terapia intensiva (UTI). Demonstraram que a sepse experimental pode ser realizada por meio de vários métodos, como infusão intravascular de endotoxinas ou bactérias vivas, peritonite bacteriana, ligadura e punção do ceco, infecção de tecidos moles, modelos de pneumonia e modelos de meningite. Os modelos animais estabelecem critérios em relação a componentes específicos do processo séptico, mas não podem reproduzir fielmente toda a complexidade clínica e a heterogenicidade dos pacientes com sepse.[11]

A icterícia obstrutiva experimental pode ser utilizada para a avaliação de translocação bacteriana em modelos animais. A ligadura do ducto biliar comum em ratos determinou translocação bacteriana para os pulmões, além de provocar alterações histopatológicas significativas neste órgão.[12] Em estudo da translocação bacteriana em ratos com icterícia prolongada pela ligadura do ducto biliar comum e que receberam injeção de *Escherichia coli* dentro da luz do íleo terminal, os resultados demonstraram que o sistema reticuloendotelial está prejudicado na obstrução biliar, com dificuldade para a remoção das bactérias no fígado em 30 minutos. Ocorreu eficaz eliminação de bactérias pelo pulmão em 30 minutos, independentemente da presença de obstrução biliar.[13,14]

## 1.1 HIPÓTESE

Na indução de sepse abdominal experimental, se fatores de agressão forem associados ao dano orgânico inicial, haverá diferentes comportamentos em relação

à repercussão pulmonar.

## 1.2 OBJETIVO

Avaliar a repercussão tecidual pulmonar através da quantidade de células polimorfonucleares e a espessura do septo alveolar em pulmões de ratos submetidos a diferentes modelos de sepse associada ou não a icterícia ou esplenectomia.

# 2 REVISÃO DA LITERATURA

## 2.1 DEFINIÇÃO DE SEPSE

Define-se sepse como resposta inflamatória sistêmica decorrente de um processo infeccioso identificado no organismo. No documento de revisão da *SurvivingSepsisCampaign*, a sepse engloba a síndrome da resposta inflamatória sistêmica(SRIS). Essa resposta é manifestada por duas ou mais das seguintes condições: temperatura acima de 38 °C ou hipotermia com temperatura abaixo de 36 °C, taquicardia com frequência cardíaca acima de 90 bpm, taquipneia apresentando frequência respiratória maior que 20 ipm ou pCO2 menor que 32 mmHg, leucocitose ou leucopenia com leucócitos acima de 12.000/ $mm^3$ ou abaixo de 4.000/$mm^3$ ou bastonetes acima de 10%.[15]

Quando a trombose microvascular se apresenta em quadro associado a sinais de má perfusão orgânica, acidose metabólica ou hiperlactatemia, a sepse é considerada grave e pode representar o estágio final da resposta inflamatória sistêmica, com envolvimento das células endoteliais, leucocitárias e múltiplos mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios.[8,16] Na sepse grave há associação com disfunção orgânica, hipoperfusão tecidual e hipotensão arterial. As anormalidades da perfusão tecidual podem incluir, mas não são limitadas, acidose lática, oligúria ou alteração do nível de consciência.[15]

A hipotensão relacionada à sepse apresenta pressão arterial sistólica menor que 90 mmHg ou uma redução acima de 40 mmHg da linha de base, na ausência de outras causas de hipotensão.[15]

No choque séptico, a sepse está relacionada com hipotensão, apesar da adequada reposição volêmica com a presença de anormalidades da perfusão, que podem estar associadas à acidose metabólica, oligúria ou alteração aguda do estado mental. Pacientes que recebem agentes inotrópicos ou vasopressores podem não estar hipotensos no momento em que as anormalidades da perfusão são medidas. [15]

A síndrome da disfunção de múltiplos órgãos (SDMO) apresenta alteração na função orgânica, que pode variar desde disfunção leve até falência total do órgão, de modo que a homeostasia não possa ser mantida sem suporte avançado de vida. Geralmente, os parâmetros são avaliados a partir de seis funções consideradas chave: pulmões, cardiovascular, renal, hepático, neurológico e de coagulação. [15]

Na persistência da hipotensão ocorre o choque séptico. Dessa forma, acontece a disfunção de órgãos e sistemas, com o que a homeostase não pode ser mantida e há necessidade de intervenção imediata para a sua manutenção.[17]

O Consenso Brasileiro de Sepse e Disfunção de Múltiplos Órgãos estabelece diferença entre infecção e sepse: na infecção ocorre uma relação entre o agente agressor e o local da agressão, tecido, cavidade ou fluido corporal, normalmente estéril; na sepse há consequente resposta do hospedeiro, o desencadeamento de uma resposta inflamatória na vigência do quadro infeccioso grave. Assim, determinar com precisão o ponto dos dois termos não é simples, pois o processo infeccioso estabelecido dar-se-á na resposta do organismo hospedeiro, com intensidade diferente estabelecida de acordo com a gravidade da agressão.[18]

Seguindo o mesmo entendimento da Conferência de Consenso de Sepse em Northbrok (Illinois, EUA, 1991), o *American College of Chest Physicians* (ACCP) e a *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) determinaram a definição de sepse para aumentar a precisão e rapidez do diagnóstico. Portanto, o paciente séptico é um paciente com síndrome da resposta inflamatória sistêmica de origem infecciosa. A resposta do organismo à infecção é uma inflamação, resposta normal do hospedeiro a agentes infecciosos. Sepse e SRIS são caracterizadas pelo aumento da produção de mediadores inflamatórios e pela ativação de células inflamatórias, resultando numa alteração metabólica e levando a que o organismo não tenha controle sobre o ciclo antígeno anticorpo. Uma das consequências da resposta inflamatória é o dano causado em muitos órgãos, com a evolução do choque para a síndrome da insuficiência de múltiplos órgãos, geralmente acompanhada de alta mortalidade. Ao ocorrer infecção ou bacteremia, a defesa do hospedeiro são as células fagocitárias, macrófagos, monócitos e polimorfonucleares, e pela via alternativa do complemento, agindo de maneira não específica. Na sequência, as imunoglobulinas e as células imunocompetentes iniciam uma resposta imune específica.[19]

Os elementos da parede bacteriana são os ativadores da resposta do hospedeiro: as endotoxinas dos microrganismos Gram-negativos e principalmente o lipídio A e o ácido teicoico daqueles Gram-positivos. Esses mediadores primários desencadeiam uma cascata inflamatória, sendo, inicialmente, liberados o fator de necrose tumoral alfa (TNFα) e a Interleucina-1 (IL-1), que estimulam intensa resposta celular, com liberação de mediadores secundários, quimiotaxia e ativação de granulócitos. Os mediadores secundários, citocinas, fatores do complemento, prostanoides, fator ativador plaquetário (PAF), espécies ativas de oxigênio, aminas, histamina e serotonina, peptídeo vaso ativo, como bradicinina e angiotensinas, responsáveis pela reativação das células fagocitárias e da cascata inflamatória, formam um ciclo vicioso inflamatório.[15]

Os principais passos na patogênese da sepse, levando ao choque séptico e à síndrome da disfunção de múltiplos órgãos, são infecção, moléculas desencadeadoras, mediadores primários, mediadores secundários, choque e SDMO. As citocinas são mediadores primários e secundários. Os fatores primários como TNFα, IL-1, IL-6 e IL-8 liberam os mediadores secundários, tais como citocinas derivadas do ácido araquidônico (PGE2, TXA2), e fator ativador de plaqueta (PAF); peptídeo vasoativo bradicinina, angiotensina, peptídeo intestinal vasoativo; as aminas são histamina e serotonina; e uma variedade de produtos derivados do complemento. A regulação se dá pelo contrabalanço do estado pró-inflamatório. A resposta compensatória é caracterizada pela produção de IL-10, IL-13, receptores de TNF-α solúveis, IL-1 e muitos outros bloqueadores de inflamação. Uma resposta compensatória exagerada pode ser prejudicial e pode levar a um choque séptico irresponsivo, que não consegue extinguir a infecção. A hemodinâmica da SIRS e a alteração vascular periférica são fatores que determinam o padrão encontrado no quadro inflamatório sistêmico. Ao se desencadear a produção de óxido nítrico sintetase induzível, eleva-se a produção de óxido nítrico pelos macrófagos, células endoteliais e musculares lisas do vaso, que têm uma ação vasodilatora.[15]

A causa mais comum de morte em pacientes com sepse é a SDMO, que se caracteriza pela deterioração aguda da função de dois ou mais órgãos.[18]

## 2.2 MODELOS EXPERIMENTAIS DE SEPSE

### 2.2.1 LIGADURA E PUNÇÃO DO CECO

A ligadura e punção do ceco (LPC) é a indução de sepse abdominal experimental que mais se aproxima da sepse humana, simulando quadros como apendicite aguda ou diverticulite aguda perfuradas. Neste procedimento, o ceco é ligado distalmente à junção ileocecal, tomando-se o cuidado de não provocar obstrução intestinal. A seguir, a parte ligada é perfurada com agulha e dependendo do calibre da mesma e do número de perfurações, pode-se produzir sepse letal ou não letal. Este modelo foi inicialmente descrito em ratos, mas tem sido utilizado com sucesso em outras espécies. A principal vantagem da LPC é a simplicidade de sua execução, realizada através de procedimento cirúrgico simples e com custo barato, dispensando a necessidade do uso de laboratório para obtenção de inóculo.[10]

### 2.2.2 INJEÇÃO INTRAPERITONIAL DE BACTÉRIAS

A inoculação de bactérias na cavidade peritoneal é outro método utilizado para a indução de sepse. Inicialmente, tentou-se a inoculação de suspensão de fezes do próprio rato, porém com efeito desapontador, pois não ocorreu o desenvolvimento de peritonite como esperado. Para superar essa dificuldade, utilizaram-se fezes humanas misturadas com sulfato de bário, sais biliares ou hemoglobina autóloga para conseguir desenvolver peritonite. A injeção intraperitoneal de suspensão de fezes leva à sepse hiperdinâmica com alta taxa de mortalidade. As vantagens deste modelo incluem boa reprodutibilidade e a possibilidade de estudar a resposta sistêmica ou em órgãos separadamente, avaliando a dinâmica da resposta inflamatória sistêmica e pulmonar, considerando-se que a peritonite polimicrobiana depende da concentração do inóculo injetado. Tanto a LPC quanto os modelos de inoculação de fezes intraperitoneal levam a diferentes concentrações de microrganismos, e a partir disso foram desenvolvidos modelos com injeção de bactérias de laboratório para a produção de peritonite. Com a injeção de *Escherichia coli* em suspensão de solução salina intraperitoneal, Ahrenholz e Simmons[20], em 1980, provocaram a morte de 100% dos ratos em 24

horas. Quando fizeram a inoculação intraperitoneal do mesmo número de bactérias junto com coágulo de sangue bovino, produziram abscesso, com retardo da mortalidade imediata, e os animais tiveram mortalidade de 90% em dez dias. Portanto, a fibrina retarda a absorção das bactérias retidas no coágulo e promove um abscesso, simulando um foco séptico localizado.[20]

## 2.3 ICTERÍCIA OBSTRUTIVA EXPERIMENTAL

No estudo experimental com ratos, a icterícia obstrutiva por ligadura do ducto biliar comum deprime o sistema imunológico. A liberação de leucócitos e a fagocitose encontram-se deficientes e os pulmões apresentam alterações histopatológicas na microscopia, como edema e células polimorfonucleares.[13]

Ao serem estudados pacientes com doença parenquimatosa crônica do fígado, foi observada uma redução da atividade fagocítica do sistema retículo-endotelial (SRE), no fígado representado pelas células de Kupffer, que são responsáveis por, aproximadamente, 80% das atividades do SRE. Foi avaliado que os monócitos possuem diversas funções na defesa contra infecções, como quimiotaxia, fagocitose, morte intracelular e funções secretórias e a produção de fatores do complemento. A depressão do SRE hepático ocorre nas hepatopatias, apesar da hiperatividade de outras localizações do SRE, como baço e medula óssea, fato que resulta no declínio acentuado da capacidade de eliminar patógenos da circulação sistêmica.[21,22]

A disfunção do SRE pode estar relacionada aos shunts intra e extra-hepáticos. Na ausência de disfunção das células de Kupffer, a existência de shunts portossistêmicos pode alterar a função do SRE, pois permite que os patógenos na circulação portal atinjam a circulação sistêmica sem passar pelos sinusóides hepáticos, onde se concentram as células do SRE. Em ratos com disfunção hepática, a função fagocitária do SRE está reduzida. [21,32]

A disfunção do SRE está relacionada à sensibilidade do hospedeiro a endotoxinas produzidas por bactérias Gram-negativas, podendo ser revertida quando a atividade do sistema é estimulada. A maior contribuição do SRE na depuração de endotoxinas derivadas do intestino é fundamentada na intrínseca

habilidade das células de Kupffer para eliminar grandes quantidades de endotoxinas, se comparado a outros macrófagos. A endotoxina tem ação mitogênica importante para o linfócito B; sua presença na circulação é estímulo para a hipergamaglobulinemia encontrada em doenças crônicas do fígado, e a atividade fagocitária extra-hepática do SRE é entendida como normal ou aumentada em portadores de hepatopatias para compensar a disfunção das células de Kupffer.[21,22]

A inibição fagocitária dos macrógafos hepáticos e a diminuição da atividade das células de Kupffer podem se dever, possivelmente, ao aumento da pressão biliar intraductal e ao acúmulo de sais biliares e bilirrubinas no sangue e no tecido hepático. A liberação de mediadores específicos, como TNFα, interleucinas e leucotrienos, pode estar correlacionada à diminuição da atividade fagocítica das células de Kupffer. Na obstrução hepática, o TNFα estaria diretamente envolvido nas alterações hepatocelulares; ainda, a esplenomegalia, verificada em alguns casos, também pode ter ocorrido em razão da inibição do sistema fagocitário mononuclear (SFM) hepático e esplênico.[23]

Na icterícia obstrutiva ocorre depressão na função dos linfócitos T da mucosa gastrintestinal, nas placas de Peyer e nos linfonodos mesentéricos, os quais possuem um papel essencial no que se refere à prevenção da translocação bacteriana.[24,12] Igualmente, há alteração no sistema fagocitário dos mononucleares e dos macrófagos em modelos experimentais ictéricos.[24,12]

Na obstrução biliar extra-hepática ocorre aumento da pressão biliar intraductal, causando interrupção do fluxo de bile para o intestino. A fagocitose dos leucócitos está deficiente na icterícia obstrutiva, e tem sido verificada a passagem de bactérias entéricas viáveis para órgãos extraintestinais considerados estéreis em estudos experimentais.[25,21,12]

A icterícia obstrutiva provoca depressão do sistema imunológico, mudança no padrão de colonização bacteriana dos intestinos e translocação de bactérias da luz intestinal para a circulação porta e sistêmica. As bactérias, ao ultrapassarem a mucosa intestinal, chegam aos linfonodos mesentéricos, atingem o ducto torácico e podem acometer o tecido pulmonar, alterando a permeabilidade alveolocapilar.[12]

## 2.4 ESPLENECTOMIA EXPERIMENTAL

O baço é um órgão linfoide que se encontra no abdome, próximo à grande curvatura do estômago, e se associa ao sistema circulatório. Sua função é a destruição das células sanguíneas e o armazenamento, filtração, fagocitose e produção de imunoglobulina. Também tem função hematopoiética, imunológica, produzindo linfócitos e monócitos; fagocita partículas estranhas, bactérias, vírus e leucócitos, além da produção e processamento de fatores séricos. Quanto maior é a virulência dos microrganismos, menor é a função fagocitária hepática e maior a esplênica, independentemente da quantidade de complemento ligada a eles.[26, 27]

A esplenectomia tem como consequência severa a sepse fulminante, que pode levar à morte em poucas horas, mesmo pacientes jovens e hígidos.[28] A complicação mais comum após a esplenectomia é a atelectasia do lobo pulmonar inferior esquerdo, seguida por hemorragias, pneumonias, pancreatites, abscessos subfrênicos, embolia pulmonar, trombose portal e sepse.[29]

Na esplenectomia ocorre leucocitose fisiológica a partir do quinto dia, porém, quando o número leucócitos aumenta acima de 15000/$mm^3$ e a relação entre plaquetas/leucócitos é menor de 20, a probabilidade de sepse no pós-operatório aumenta significativamente, e não deve ser considerada como condição fisiológica. Nestes pacientes deve-se aumentar a vigilância e instalar precocemente medidas enérgicas em relação à sepse.[30]

Além de seu reconhecido papel imunológico e metabólico, o baço tem outras funções orgânicas, não se restringindo ao sistema de defesa; atua em outros processos fisiológicos, como o metabolismo lipídico e de bilirrubinas. Este órgão é também importante no controle dos elementos sanguíneos, em especial leucócitos e plaquetas, que são armazenados em seu parênquima. Em ratos submetidos a situações de esforço físico maior, o baço contrai-se por estímulo adrenérgico e lança na circulação parte do sangue armazenado em seu parênquima. Esse fenômeno parece ter por propósito o aumento da volemia e o aporte de oxigênio aos tecidos, melhorando o desempenho físico. Outro efeito pós-exercício é a leucocitose, que também pode ter relação com a atividade esplênica.[28]

Franco et al. associaram que a esplenectomia, com a consequente retirada de plaquetas jovens e com melhor poder de hemostasia presentes no baço, levou à diminuição da resposta inflamatória aguda de camundongos quando da ausência do baço.[31]

Alberti et al. avaliaram a mortalidade de ratos pós-esplenectomia, separando machos e fêmeas. A mortalidade nos ratos machos foi significativamente maior que nas fêmeas, concluindo que estas apresentam maior resistência à asplenia em relação aos machos.[29]

## 2.5 ALTERAÇÕES PULMONARES NA SEPSE

Sepse, choque, trauma, múltiplas transfusões e pancreatite aguda são algumas situações clínicas que desencadeiam a ativação da resposta inflamatória aguda em nível sistêmico. Uma das manifestações mais precoces é a disfunção e o comprometimento das propriedades da barreira pulmonar, tendo como consequência a ativação do endotélio pulmonar, dos macrófagos alveolares e do interstício, das moléculas de adesão e da produção de citocinas e quimiocinas, que induzem a um sequestro em massa de neutrófilos dentro da microcirculação pulmonar.[32]

Os neutrófilos ativados produzem grande quantidade de mediadores inflamatórios, que incluem espécies reativas de oxigênio, tais como OH e O2, óxido nítrico, citocinas, quimiocinas, proteases e proteínas catiônicas. Além de ativar os neutrófilos, as outras células que compõem a unidade alveolar, incluindo os monócitos pulmonares e os macrófagos, bem como as células pulmonares endoteliais e epiteliais, contribuem significativamente para a produção de mediadores inflamatórios. Os neutrófilos são a principal fonte de produção de espécies reativas de oxigênio na síndrome da lesão pulmonar aguda e da síndrome da angústia respiratória aguda (SARA).[32]

A sepse é originada por bacteremia ou endotoxemia, causadora da SARA, ativando os mediadores endógenos e leucócitos, causando inflamação intravascular e falência cardiopulmonar. No pulmão, as células do endotélio vascular são acometidas por danos visíveis; consequentemente, ocorre o aumento da

permeabilidade vascular, da congestão na microcirculação e do edema intersticial, diminuindo-se os espaços intra-alveolares. As alterações da complacência pulmonar e da elastância pulmonar originam-se do aumento da permeabilidade vascular, levando ao edema pulmonar.[18]

A endotoxina libera substâncias no pulmão, ativando e sequestrando neutrófilos, proteínas de adesão endotelial e citocinas. Por sua vez, as células do sistema imunológico, macrófagos e neutrófilos ativados, assumem função nas lesões endoteliais e parenquimatosas nos diversos tecidos, principalmente no pulmão, no fígado e no mesentério. Isso se reflete na diminuição da função dos pulmões, dos rins, do coração, do sistema de coagulação e do cérebro.[4]

# 3 MÉTODO

O trabalho foi realizado utilizando como amostra pulmões coletados de três estudos experimentais do mesmo grupo de pesquisa, os quais utilizaram ratos machos, *Rattus novergicus albinus*, *Rodentia mammalia*, da linhagem Wistar, com idade entre 100 e 130 dias, peso entre 250 e 330g, provenientes do Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da PUCPR. Os procedimentos operatórios foram realizados no laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da PUCPR, seguindo rigorosamente as normas para experimentação em animais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

As avaliações foram realizadas por meio de estudo histológico dos pulmões do lado direito de ratos submetidos a diferentes modelos de indução de sepse, seja pela ligadura e punção do ceco, seja por injeção intraperitoneal de bactérias *Escherichia coli (E. coli*) associados ou não a icterícia ou esplenectomia. Ressalta-se que os pulmões dos ratos que foram a óbito no experimento, foram descartados durante o estudo.

### *1) Experimento Escherichia coli*

Foram utilizados 40 ratos Wistar como modelos de sepse abdominal. Nos animais do grupo A houve indução de peritonite por injeção intraperitoneal de $10^8$ UFC/ml de *E. coli* ATCC 25922; no grupo B a peritonite foi induzida por LPC. Os animais do grupo A foram subdivididos em A1(n=8), com eutanásia após 24 horas, e A2 (n=8), com eutanásia após 48 horas de peritonite. Os animais do grupo B foram subdivididos em B1(n=8), com eutanásia após 24 horas, e B2 (n=8), com eutanásia após 48 horas de peritonitepor LPC. Em todos os subgrupos realizaram-se *swab* da cavidade peritoneal, dosagem de creatinina e TNF-α, fluxometria hepática e renal e avaliação histológica do tecido pulmonar e renal. O grupo de controle (n=8), subdividido em C1(n=4), com eutanásia após 24 horas, e C2 (n=4) com eutanásia

após 48 horas de laparotomia, foi utilizado para a avaliação dos parâmetros dos exames laboratoriais e patológico.

Os animais do grupo de controle foram anestesiados por via intramuscular, com quetamina e xilasina, nas doses de 90mg/kg e 10mg/kg, respectivamente. Após tricotomia e antissepsia, foi realizada laparotomia mediana infraumbilical de aproximadamente 3 cm, com abertura e exploração da cavidade peritoneal e coleta de secreção peritonial para cultura. Através de fluxômetro a *laser* Laserflow Vasamedics®, foi realizada a medição do fluxo renal bilateralmente e hepático e, por punção cardíaca, sofreram eutanásia pelo método de exanguinação, com coleta de amostra sanguínea para dosagem de TNF-α e creatinina. A seguir, removeram-se os pulmões e rins para exame anatomopatológico.

No grupo de injeção intraperitonial de *E. coli* foi realizada, inicialmente, anestesia por via intramuscular, com quetamina e xilasina, na dose de 90mg/kg e 10mg/kg, respectivamente, e, após, antissepsia abdominal , punção peritonial junto à fossa ilíaca esquerda com injeção de suspensão de *E. coli* ATCC 25922 $1x10^8$ UFC/ml. A seguir, os animais foram recuperados da anestesia e liberada a dieta própria para a espécie e água.

No grupo de ligadura e punção do ceco foram realizados procedimentos na seguinte ordem: anestesia por via intramuscular com quetamina e xilasina, na dose de 90mg/kg e 10mg/kg, respectivamente. Após antissepsia do abdome com álcool iodado, realizou-se incisão mediana infraumbilical de aproximadamente três cm; exposição do ceco e ligadura da sua parte livre com fio de algodão 3-0 e cinco punções com agulha hipodérmica 40x12 (18G x 1 ½"). Redução do ceco para a cavidade peritoneal e sutura contínua da parede em dois planos com náilon 4-0. Seguiu-se recuperação da anestesia com liberação de dieta própria para a espécie e água.

Após 24 ou 48 horas, conforme o subgrupo, os animais sofreram novamente anestesia por via intramuscular, com quetamina e xilasina nas mesmas doses anteriores. Após antissepsia do abdome com álcool iodado, realizou-se incisão mediana xifo-púbica com abertura e exploração da cavidade peritoneal, coleta de *swab* peritonial para cultura; medição do fluxo renal bilateralmente e hepático; exanguinação por punção cardíaca para dosagem de TNF-α e creatinina, além da remoção dos pulmões e rins para exame anatomopatológico.

***2) Experimento Esplenectomia***

O experimento utilizou 40 ratos Wistar machos adultos. Todos os animais foram submetidos à anestesia com quetamina e xilasina nas doses já descritas e, após antissepsia do abdome, submetidos à laparotomia mediana e esplenectomia. Após 14 dias, foram separados em dois grupos: Grupo controle (n=10), no qual os ratos, após anestesia, foram submetidos a nova laparotomia e sutura da parede abdominal. Aguardadas 24 horas, novamente os animais foram anestesiados e por meio de laparotomia xifopúbica, foi aferido o fluxo sanguíneo renal bilateralmente e hepático com aparelho de fluxometria a *laser*. Por punção cardíaca sofreram eutanásia e foram retirados os pulmões, rins e fígado para análise histológica; Grupo experimento (n=30): estes animais foram submetidos a nova laparotomia, com indução a sepse por ligadura e punção do ceco, e 24 horas mais tarde realizada aferição do fluxo sanguíneo renal e hepático, com posterior eutanásia para retirada dos pulmões, rins e fígado para análise histológica, de modo semelhante ao grupo controle.

***3) Experimento Icterícia Obstrutiva***

O experimento Icterícia Obstrutiva foi composto por 30 ratos Wistar machos adultos. Apresentou modelos de sepse abdominal e peritonite com ou sem icterícia por ligadura do ducto biliar comum.

Os ratos estavam distribuídos em três grupos de dez, nos quais se avaliou a resposta inflamatória relacionada à peritonite fecal em presença de icterícia: Grupo de controle GH (n=10): os ratos foram submetidos à laparotomia, 240 horas e laparotomia 24 horas, nono dia; Grupo Ec (n=5): dez dias de icterícia (LDBC) e peritonite induzida por 24 horas no nono dia por ligadura e punção do ceco, sepse resultando em cinco óbitos; Grupo F (n=10): que foram submetidos à ligadura do ducto biliar comum, icterícia, por dez dias e laparotomia no nono dia por 24 horas, seguida de eutanásia para retirada das vísceras e coleta de sangue. A técnica operatória seguiu rigorosamente as normas para experimentação em animais.

Após 24h do nono dia de indução de sepse ou somente laparotomia, os animais sofreram novamente anestesia por via intramuscular, com quetamina e

xilasina nas mesmas doses anteriores. Após antissepsia do abdome com álcool iodado, realizou-se incisão mediana xifopúbica com abertura e exploração da cavidade peritoneal, exanguinação por punção cardíaca para dosagem de TNF-α e creatinina, além da remoção dos pulmões e rins para exame anatomopatológico.

## 3.1 DESCRIÇÕES DOS DADOS GERAIS

Para avaliar os dados foi elaborada uma legenda, na qual se descrevem os grupos (G) em relação às técnicas e ao tempo de experimento com os pulmões direito (D); ligadura e punção do ceco (LPC); grupo experimento (GE); grupo controle (GCtrl); icterícia (Ict); esplenectomia (Esplen); *Escherichia coli* (*E.coli*); células polimorfonucleares (PMN), laparotomia (lap).

Os códigos representados e suas respectivas descrições demonstram que o experimento *E. coli* divide-se em seis grupos, denominados $GA_1$: n=8 *E.coli* 24h; $GA_2$: n=4 *E.coli* 48h; $GB_1$: n=8 LPC 24h; $GB_2$: n=6 LPC 48h; $GC_1$: n=4 Controle 24h, $GC_2$: n=4 Controle 48h. O experimento Esplenectomia apresenta dois grupos, o GC: n= 3 Controle Esplen 360h; GE: n=23 Esplen 360h/LPC de 24h no 14°dia. Correspondem ao experimento Icterícia três grupos, o GH: n=10 Controle lap 240h/lap24h; GEc: n=5 Ict 240h/LPC 24h; GF: n=10 Ict 240h/ lap 24h.

TABELA 1 - RELAÇÃO EXPERIMENTO GRUPO

| *Experimento* | *N* | *Grupo* |
|---|---|---|
| *E.coli* | 34 | $GA_1$ |
| | | $GA_2$ |
| | | $GB_1$ |
| | | $GB_2$ |
| | | $GC_1$ |
| | | $GC_2$ |
| Esplenectomia | 26 | GC |
| | | GE |
| Icterícia Obstrutiva | 25 | GH |
| | | GEc |
| | | GF |

Na Tabela 2 demonstra-se a divisão do número de animais por grupos e subgrupos, observando-se o número de animais que foram a óbito em todos os experimentos.

TABELA 2 - LEGENDA TÉCNICA E TEMPO DE INDUÇÃO

| ***Experimento*** | ***n*** | ***Grupo e tempo de indução*** |
|---|---|---|
| *E.coli* | 34 | $GA_1$: n=8 *E.coli* 24h<br>$GA_2$: n=4 *E.coli* 48h(quatro óbitos);<br>$GB_1$: n=8 LPC 24h<br>$GB_2$: n=6 LPC 48h(dois óbitos);<br>$GC_1$: n=4 Controle 24h<br>$GC_2$: n=4 Controle 48h. |
| Esplenectomia | 26 | GC: n=3 Controle Esplen 360h/ *sham* 24(lap) (sete óbitos);<br>GE: n=23 Esplen 360h/LPC de 24h no 14°dia (sete óbitos). |
| Icterícia Obstrutiva | 25 | GH: n=10 Controle *sham* 240h/*sham* 24h(lap);<br>GEc: n=5 Ict 240h/LPC 24h (cinco óbitos);<br>GF: n=10 Ict 240h/ *sham* 24(lap). |

## 3.2 COLETA DOS PULMÕES

Na etapa operatória final, com os animais já em óbito após a eutanásia, os pulmões foram removidos por toracotomia mediana, dissecção e secção do hilo do pulmão, secção da traqueia e infusão de formol a 10% tamponado na luz traqueal, para evitar o colabamento dos alvéolos. Em seguida, foi realizada secção dos lobos caudais de cada um dos pulmões. Esses fragmentos pulmonares foram pesados e acondicionados em frascos com formol a 10% tamponado.

## 3.3 MONTAGEM DAS LÂMINAS HISTOLÓGICAS

Após, foram realizados cortes de, aproximadamente, 0,5µm e preparo para a fixação em lâmina, com a coloração de HE e posterior leitura. Fizeram parte do protocolo de preparo de lâminas histológicas as seguintes etapas: a fixação; a desidratação, diafanização e impregnação; a inclusão; microtomia; o banho histológico; a secagem; a desparafinização, desidratação e reidratação. O corte já

aderido à lâmina de vidro (pescagem em banho-maria) é banhado no xilol para a dissolução da parafina.[33,34]

O corte é imerso em uma série de concentrações decrescentes de álcool etílico até que esteja hidratado; estando o corte hidratado, procede-se à coloração propriamente dita, que consiste, no caso da técnica HE, na imersão do tecido, primeiramente, em hematoxilina e, após, na lavagem com água para retirada de excedente; depois, imersão em eosina e também lavagem. Por fim, ocorre a coloração, em que a combinação mais comum de corantes usada em histologia e histopatologia são a hematoxilina e eosina (HE). A hematoxilina não é realmente um corante e deve ser oxidada em hemateína, a fim de tornar-se um corante; por isso, deve ser usado um mordente, como o alumínio ou o ferro, juntamente com a mistura de hematoxilina, antes que ela possa corar os tecidos. A mistura cora em azul-púrpura. A eosina é um corante sintético e produz uma coloração vermelha. Os componentes dos tecidos que se coram prontamente com os corantes básicos são chamados basófilos, e os que têm afinidade pelos corantes ácidos, acidófilos. A hematoxilina comporta-se como um corante básico e, portanto, cora o núcleo de modo basófilo. Por sua vez, a eosina é um corante ácido e cora os elementos básicos da proteína do citoplasma de maneira acidófila.[33,34]

A montagem ocorre depois que o corte tiver sido corado com a solução apropriada, passado através de concentrações crescentes de álcool, para ser removida novamente a água (desidratação). Objetiva-se com esta desidratação aumentar a sobrevida do preparado histológico. Uma gota do meio de montagem é colocada sobre o corte ou na lamínula, a qual é posicionada sobre o corte de modo delicado, de forma que o meio de montagem cubra completamente o corte. Depois a lamínula é comprimida com firmeza sobre o corte e o meio de montagem se espalha, formando uma delgada película entre a lâmina e a lamínula, as quais posteriormente vão estar firmemente aderidas uma à outra pela estabilização do meio de montagem.[33]

Após o preparo das lâminas, iniciou-se a leitura histológica do material utilizando a técnica convencional (HE), para avaliação da infiltração de células inflamatórias leucocitárias, alterações do tecido, através do edema do septo alveolar. A análise das alterações teciduais pulmonares dos ratos foi realizada no Laboratório de Patologia da PUCPR.

## 3.4 MORFOMETRIA

No estudo histológico, os fragmentos pulmonares foram submetidos à análise morfométrica, com auxílio de uma grade ocular de contagem, sob um aumento de 400 e 1000, onde se contou o número de polimorfonucleares numa área de 100 x 100 µm, delimitada pela grade ocular que tangenciava um bronquíolo.

Nos tecidos foram avaliados os aspectos de resposta inflamatória aguda tecidual pela contagem de polimorfonucleares (Figura 1 e Figura 2) e a medida em micra para o edema (Figura 3 e Figura 4), por meio da histomorfometria. A análise da imagem digital manual ou automatizada envolve medidas e comparações de áreas geométricas selecionadas, perímetros, comprimentos, ângulos de orientação, fatores morfológicos, centro de gravidade, coordenadas, bem como reforço da imagem.[35] A leitura do edema do septo alveolar é feita em cada lâmina, sendo visualizados dez campos com dez medidas aleatórios, visando à maior confiabilidade para cada campo; após, foi realizada medida aritmética, e, para os PMN, foram fotografados quatro campos aleatórios, estes divididos em quatro campos, realizando-se a contagem das células, somando-as entre si e multiplicando-as com os outros campos para obter o resultado total, em objetiva de 40x (em tela de 640X480 *pixels*).[36] As fotos são visualizadas com aumento de 40x e 100x, pois na morfometria não há diferença se a foto é de 20x ou 40x, já que o aumento é calibrado no computador; o resultado é proporcional ao número do aumento. O procedimento descrito contribuiu para maior precisão dos resultados com a fotomicrografia.

A morfometria é a atividade de medir estruturas anatômicas e tem uma ampla aplicação na ciência; sua finalidade é tornar mais objetivas e precisas a coleta, a apresentação e a análise dos resultados obtidos em pesquisas e na rotina de laboratório, permitindo, ainda, relacionar as diferentes estruturas anatômicas com as suas funções. A morfometria computadorizada interativa surgiu na década de 70, quando os primeiros aparelhos permitiam apenas que as medidas fossem feitas com a participação direta do pesquisador, contornando as estruturas a serem medidas. As medidas foram realizadas pelo *software* Image Proplus versão 4.5, com câmeras de captura de imagens Sony, CCD-Ires, ligadas ao microscópio Olympus modelo bx50.

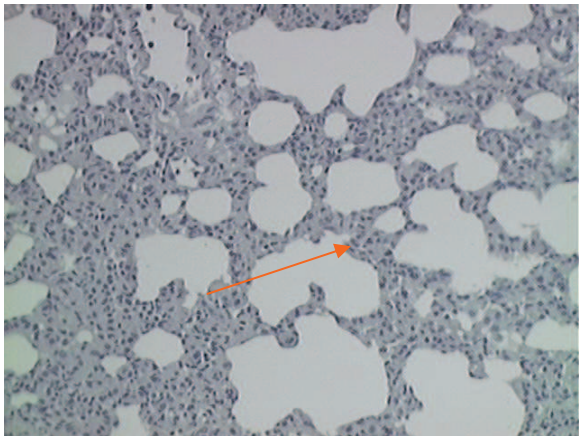

Figura 1 - Fotomicrografia Aspecto histológico do pulmão D rato 3A, Experimento Icterícia Obstrutiva GEc seta indicando PMN (HE 400X)

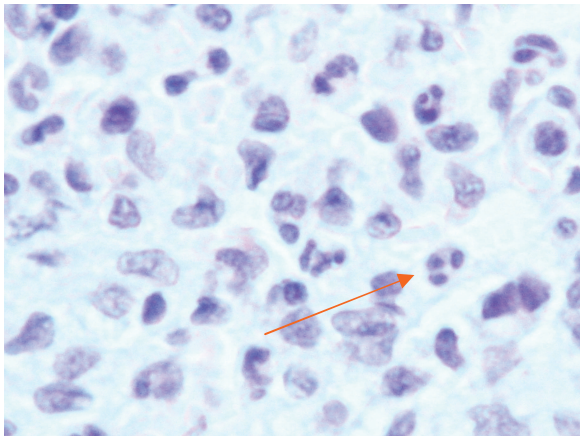

Figura 2 - Fotomicrografia pulmão D rato V Experimento Esplenectomia/LPC 360h seta indicando PMN (HE 1000X)

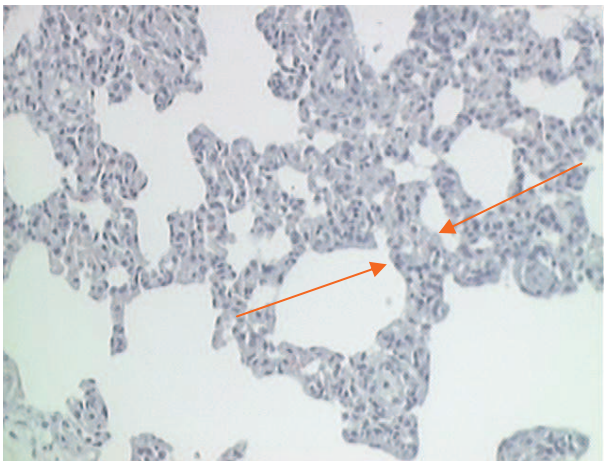

Figura 3 - Fotomicrografia pulmão D rato 26 Experimento *E. coli* GA Eschirichia coli 24h seta indicando referência da medida do septo (HE 400X)

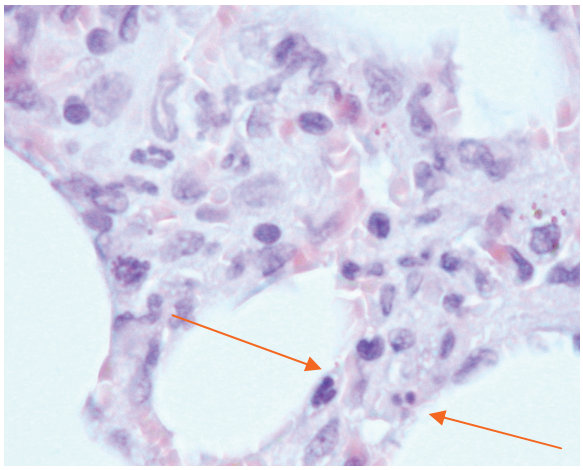

Figura 4 - Fotomicrografia pulmão D rato 26 Experimento *E. coli* GA Eschirichia coli 24h seta indicando referência medida do septo (HE 1000X)

## 3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As informações obtidas foram armazenadas em um banco de dados e analisadas pelo *software* estatístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 10. Os resultados, obtidos por média aritmética, foram submetidos à análise estatística. A análise dos achados morfométricos utiliza o teste estatístico de Kruskal-Wallis, pela qual podem ser comparadas três ou mais amostras, com tipos de relação não pareada, distribuição não normal e escala numérica ordinal, intervalar ou razão.[37] O cálculo dos dados obtidos foi realizado mediante nível de significância de 5%; uma vez verificados, os resultados foram validados somente para os que apresentaram $p \leq 0,05$ de confiabilidade. Valores de $p \leq 0,05$ foram

considerados estatisticamente confiáveis.

# 4 RESULTADOS

Nos experimentos, observaram-se óbitos relacionados às técnicas utilizadas. No experimento *E.coli,* houve um total de seis óbitos, quatro óbitos no $GA_2$ e dois óbitos no $GB_2$; no experimento Esplenectomia, quatorze óbitos, sete no grupo controle e sete do grupo experimento e, no experimento e Icterícia, cinco óbitos GEc.

## 4.1 COMPARAÇÕES DOS CRUZAMENTOS DO EXPERIMENTO *Escherichia coli,* ESPLENECTOMIA E ICTERÍCIA

O experimento *E.coli* apresentou cruzamentos entre $GA_1$ x $GA_2$, $GB_1$ x $GB_2$, $GA_1$ x $GC_1$, $GB_1$ x $GC_1$, $GA_2$ X $GC_2$, $GB_2$ x $GC_2$, $GA_1$ x $GB_1$, $GA_1$ x $GB_2$ e cruzaram-se com os experimentos Esplenectomia e Icterícia obstrutiva. Considera-se que os experimentos cruzados entre si são validados para o experimento em sentido inverso.

### 4.1.1 COMPARAÇÕES DE PMN DOS CRUZAMENTOS DO EXPERIMENTO *Escherichia coli*

Na Tabela 3 observam-se os resultados do cruzamento do grupo controle ($GC_1$) com os demais grupos. Nos cruzamentos do experimento *E. coli* entre $GB_1$ e $GA_1$ com $GC_1$ apresentaram-se resultados significantes para as células polimorfonucleares em relação ao controle 24 horas. Os dados referentes à variável polimorfonucleares dos experimentos *E.coli,* Esplenectomia e Icterícia encontram-se dispostos entre média, variância e desvio-padrão.

Todos os grupos foram cruzados com o experimento *E.coli*. O experimento *E.coli* $GC_1$ correlacionou-se com o experimento *E.coli* no $GB_1$; $GC_2$; $GB_2$; $GA_1$; $GA_2$. Com o experimento Esplenectomia houve significância com os grupos GE e GC.

Com o experimento Icterícia obstrutiva houve diferença significativa com os grupos GEc, GH e GF.

TABELA 3 - COMPARAÇÕES DE PMN DOS $GC_1$ COM $GB_1$ E $GA_1$

| POLIMORFONUCLEARES | | n | MEDIA | MEDIANA | VARIANCIA | DESV. PADRAO | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $GC_1$ | CONTROLE 1 | 4 | 3,00 | 2,00 | 14,67 | 3,83 | |
| $GB_1$ | LPC 1 | 8 | 99,00 | 102,00 | 1804,57 | 42,48 | 0,006* |
| $GA_1$ | *E.coli* 1 | 8 | 116,00 | 124,00 | 1353,14 | 36,79 | 0,006* |

Teste de kruskal-wallis; *significativo

Na Tabela 4 faz-se o cruzamento da contagem de PMN no pulmão de ratos do $GC_2$ controle 48h, $GA_2$ infiltração de *E.coli* 48h e $GB_2$ com LPC 48h. Demonstra-se que o resultado não apresentou diferença significativa entre os grupos controle, *E. coli* e LPC 48 horas.

TABELA 4 - COMPARAÇÕES DE PMN DOS $GB_2$ E $GA_2$

| POLIMORFONUCLEARES | | n | MEDIA | MEDIANA | VARIANCIA | DESV. PADRAO | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $GC_2$ | CONTROLE 1 | 4 | 118,00 | 118,00 | 773,33 | 27,81 | |
| $GB_2$ | LPC 2 | 6 | 145,33 | 158,00 | 1943,47 | 44,09 | 0,394 |
| $GA_2$ | *E.coli* 2 | 4 | 98,00 | 110,00 | 1669,33 | 40,86 | 0,663 |

Teste de kruskal-wallis; *significativo

## 4.1.2 COMPARAÇÕES DAS MEDIDAS DO SEPTO ALVEOLAR DO EXPERIMENTO *Escherichia coli*

Na Tabela 5 compara-se o resultado da medida do septo de animais submetidos à peritonite por injeção intraperitonial de *E. Coli* ($GA_1$) e ratos com icterícia e sepse por LPC (GEc). O edema do septo é significativamente maior quando a peritonite é desencadeada por injeção intraperitonial de bactérias.

TABELA 5 - COMPARAÇÕES DA MEDIDA DO SEPTO ALVEOLAR DOS $GA_1$ COM GEc

| SEPTO ALVEOLAR | | n | MEDIA | MEDIANA | VARIANCIA | DESV. PADRAO | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $GA_1$ | *E.coli* 1 | 8 | 29,26 | 27,00 | 61,57 | 7,85 | |
| GEc | ICTERICIA240/ LPC | 5 | 9,19 | 8,89 | 2,50 | 1,58 | 0,003* |

Teste de kruskal-wallis; * significativo

A Tabela 6 apresenta a relação das comparações do experimento *E.coli,* do septo alveolar, $GB_1$ LPC 24h, pulmão direito, com $p \leq 0,05$, em relação ao GEc, Ict 240h/Sepse 24h; e GF, Ict 240h/ *sham* 24.

TABELA 6 - COMPARAÇÕES DA MEDIDA DO SEPTO ALVEOLAR DOS $GB_1$ COM GEc E GF

| SEPTO ALVEOLAR | | n | MEDIA | MEDIANA | VARIANCIA | DESV. PADRAO | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $GB_1$ | LPC 1 | 8 | 20,39 | 20,60 | 8,96 | 2,99 | |
| GEc | ICTERICIA240/ LPC | 5 | 9,19 | 8,89 | 2,50 | 1,58 | 0,003* |
| GF | ICTERICIA240/*sham* | 10 | 13,06 | 11,92 | 14,61 | 3,82 | 0,003* |

Teste de kruskal-wallis; * significativo

A Tabela 7 apresenta a relação das comparações do experimento *E.coli,* do septo alveolar, $GC_1$ controle 24h, pulmão direito, com $p \leq 0,05$, mostrando um índice de confiabilidade em relação ao $GB_1$ LPC 24h e $GC_2$ controle 48h. Não ocorreu diferença significativa de animais submetidos à peritonite por injeção intraperitonial de *E. coli* 24h ($GA_1$), *E. coli* 48h *(*$GA_2$), e LPC 48h ($GB_2$).

TABELA 7 - COMPARAÇÕES DA MEDIDA DO SEPTO ALVEOLAR DOS $GC_1$ COM $GC_2$, $GB_1$, $GB_2$, $GA_1$ E $GA_2$

| SEPTO ALVEOLAR | | n | MEDIA | MEDIANA | VARIANCIA | DESV. PADRAO | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $GC_1$ | CONTROLE | 4 | 29,89 | 30,20 | 1,12 | 1,06 | |
| $GC_2$ | CONTROLE | 4 | 22,49 | 22,56 | 6,89 | 2,63 | 0,021* |
| $GB_1$ | LPC 1 | 8 | 20,39 | 20,60 | 8,96 | 2,99 | 0,007* |
| $GB_2$ | LPC 2 | 6 | 26,29 | 25,38 | 11,48 | 3,39 | 0,136 |
| $GA_1$ | *E.coli* 1 | 8 | 29,26 | 27,52 | 61,57 | 7,85 | 0,497 |
| $GA_2$ | *E.coli* 2 | 4 | 28,79 | 25,84 | 39,30 | 6,27 | 0,248 |

Teste de kruskal-wallis; * significativo

A Tabela 8 apresenta a relação das comparações do experimento *E.coli,* do septo alveolar, $GC_2$ controle 48h, pulmão direito, com $p \leq 0,05$, mostrando um índice de confiabilidade em relação a *E. coli* 48h *(*$GA_2$). Não ocorreu diferença significativa de animais submetidos à peritonite por LPC 48h ($GB_2$).

TABELA 8 - COMPARAÇÕES DA MEDIDA DO SEPTO ALVEOLAR DOS $GC_2$ COM $GA_2$ E $GB_2$

| SEPTO ALVEOLAR | | n | MEDIA | MEDIANA | VARIANCIA | DESV. PADRAO | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $GC_2$ | CONTROLE 1 | 4 | 22,49 | 22,56 | 6,89 | 2,63 | |
| $GA_2$ | *E.coli* 2 | 4 | 28,79 | 25,84 | 39,30 | 6,27 | 0,021* |
| $GB_2$ | LPC 2 | 6 | 26,29 | 25,38 | 11,48 | 3,39 | 0,088 |

Teste de kruskal-wallis; * significativo

## 4.2 COMPARAÇÕES DOS CRUZAMENTOS DO EXPERIMENTO ESPLENECTOMIA

O experimento Esplenectomia apresentou cruzamentos entre GE x GC e cruzaram-se com experimentos *E.coli,* e Icterícia. Considera-se que os experimentos cruzados entre si são validados para o experimento em sentido inverso.

### 4.2.1 COMPARAÇÕES DE PMN DOS CRUZAMENTOS DO EXPERIMENTO ESPLENECTOMIA

Os dados da Tabela 9 demonstram a comparação do experimento Esplenectomia com relação ao grupo controle que sofreu esplenectomia (GE), no qual foi realizada previamente esplenectomia e, após 14 dias, associou-se LPC por 24h. Observa-se o aumento significativo de PMN no grupo em que foi induzida LPC.

TABELA 9 - COMPARAÇÕES DE PMN DOS GE COM GC

| POLIMORFONUCLEARES | | n | MEDIA | MEDIANA | VARIANCIA | DESV. PADRAO | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GE | Esplen360/LPC | 23 | 212,35 | 192,00 | 12908,96 | 113,62 | |
| GC | Esplen360/*sham* | 3 | 36,00 | 40,00 | 336,00 | 18,33 | 0,006* |

Teste de kruskal-wallis; * significativo

Na Tabela 10 o resultado da comparação entre animais esplenectomizados e submetido à sepse por 24h demonstrou diferença significativa tanto em relação a animais submetidos à sepse por 24h quanto a animais submetidos à icterícia por 10 dias e sepse por 24h.

TABELA 10 - COMPARAÇÕES DE PMN DOS GE COM $GB_1$ E GEc

| POLIMORFONUCLEARES | | n | MEDIA | MEDIANA | VARIANCIA | DESV. PADRAO | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GE | Esplen360/LPC | 23 | 212,35 | 192,00 | 12908,96 | 113,62 | |
| $GB_1$ | LPC 1 | 8 | 99,00 | 102,00 | 1804,57 | 42,48 | 0,004* |
| GEc | ICTERICIA240/ LPC | 5 | 98,40 | 92,00 | 548,80 | 23,43 | 0,012* |

Teste de kruskal-wallis; * significativo

Na Tabela 11 compara-se o resultado da contagem de PMN em pulmões de animais submetidos previamente à esplenectomia (GE) e após 14 dias sofreram LPC com ratos submetidos à peritonite por injeção intraperitonial de *E. coli* ($GA_1$) e ratos submetidos à icterícia por 10 dias e LPC para desenvolver sepse por 24h. Ocorreu aumento significativo de PMN nos animais esplenectomizados em comparação com os demais.

TABELA 11 - COMPARAÇÕES DE PMN DOS GE COM $GA_1$ E GEc

| POLIMORFONUCLEARES | | n | MEDIA | MEDIANA | VARIANCIA | DESV. PADRAO | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GE | Esplen360/LPC | 23 | 212,35 | 192,00 | 12908,96 | 113,62 | |
| $GA_1$ | *E.coli* 1 | 8 | 116,00 | 124,00 | 1353,14 | 36,79 | 0,010* |
| GEc | ICTERICIA240/ LPC | 5 | 98,40 | 92,00 | 548,80 | 23,43 | 0,012* |

Teste de kruskal-wallis; * significativo

## 4.2.2 COMPARAÇÕES DAS MEDIDAS DO SEPTO ALVEOLAR DO EXPERIMENTO ESPLENECTOMIA

Na Tabela 12 verifica-se a comparação da medida do septo alveolar do experimento Esplenectomia. Ocorreu aumento significativo da medida do septo no grupo controle esplenectomia 360h GC em relação ao grupo que sofreu esplenectomia 360h com sepse 24h por LPC (GE).

TABELA 12 - COMPARAÇÕES DA MEDIDA DO SEPTO ALVEOLAR DOS GC COM GE

| SEPTO ALVEOLAR | | n | MEDIA | MEDIANA | VARIANCIA | DESV. PADRAO | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GC | Esplen360/*sham* | 3 | 34,11 | 33,66 | 6,62 | 2,57 | |
| GE | Esplen360/LPC | 23 | 24,31 | 23,55 | 88,63 | 9,41 | 0,05* |

Teste de kruskal-wallis; *significativo

Na Tabela 13 compara-se a medida do septo alveolar do grupo que sofreu esplenectomia e LPC (GE) com o grupo submetido à icterícia e LPC (GEc) e o grupo LPC por 24h ($GB_1$). O resultado demonstra uma diminuição significativa da espessura do septo de animais com icterícia em relação a animais esplenectomizados, fato não observado em relação a ratos com LPC por 24h ($GB_1$).

TABELA 13 - COMPARAÇÕES DA MEDIDA DO SEPTO ALVEOLAR DOS GE COM GEc E $GB_1$

| SEPTO ALVEOLAR | | n | MEDIA | MEDIANA | VARIANCIA | DESV. PADRAO | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GE | Esplen360/LPC | 23 | 24,31 | 23,55 | 88,63 | 9,41 | |
| GEc | ICTERICIA240/ LPC | 5 | 9,19 | 8,89 | 2,50 | 1,58 | 0,001* |
| $GB_1$ | LPC 1 | 8 | 20,39 | 20,60 | 8,96 | 2,99 | 0,367 |

Teste de kruskal-wallis; * significativo

Na Tabela 14 comparam-se os resultados da medida de septo alveolar entre o grupo de animais submetidos à esplenectomia e LPC (GE) com aqueles submetidos à icterícia e LPC (GEc) e aos animais com sepse por injeção de *E. coli* intraperitonial ($GA_1$). Obteve-se diminuição significativa na medida do septo quando comparados os animais submetidos à icterícia e LPC (GEc) com aqueles esplenectomizados e com sepse (GE). Por outro lado, houve o aumento significativo na comparação da medida do septo dos animais submetidos à peritonite por injeção de bactérias ($GA_1$) e aqueles esplenectomizados e submetidos à LPC (GE).

TABELA 14 - COMPARAÇÕES DA MEDIDA DO SEPTO ALVEOLAR DOS GE COM GEc E $GA_1$

| SEPTO ALVEOLAR | | n | MEDIA | MEDIANA | VARIANCIA | DESV. PADRAO | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GE | Esplen360/LPC | 23 | 24,31 | 23,55 | 88,63 | 9,41 | |
| GEc | ICTERICIA240/ LPC | 5 | 9,19 | 8,89 | 2,50 | 1,58 | 0,001* |
| $GA_1$ | *E.coli* 1 | 8 | 29,26 | 27,52 | 61,57 | 7,85 | 0,003* |

Teste de kruskal-wallis; * significativo

## 4.3 COMPARAÇÕES DOS CRUZAMENTOS DO EXPERIMENTO ICTERÍCIA OBSTRUTIVA

O experimento Icterícia obstrutiva apresentou cruzamentos entre GH x GEc, GH x GF e cruzaram-se com os experimentos *E.coli,* Esplenectomia. Considera-se que os experimentos cruzados entre si são validados para o experimento em sentido inverso.

### 4.3.1 COMPARAÇÕES DE PMN DOS CRUZAMENTOS DO EXPERIMENTO ICTERÍCIA

Na Tabela 15 têm-se os resultados da contagem de PMN no experimento Icterícia. Cruzou-se o resultado obtido na histologia pulmonar de ratos submetidos apenas à laparotomia (GH), animais que sofreram icterícia por 10 dias (GF) e animais que sofreram icterícia por 10 dias associada peritonite (GEc).

TABELA 15 - COMPARAÇÕES DE PMN DOS GH COM GEc E GF

| POLIMORFONUCLEARES | | n | MEDIA | MEDIANA | VARIANCIA | DESV. PADRAO | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GH | CONTROLE *Sham* | 10 | 46,80 | 48,00 | 217,07 | 14,73 | |
| GEc | ICTERICIA240/ LPC | 5 | 98,40 | 92,00 | 548,80 | 23,43 | 0,003* |
| GF | ICTERICIA240/*sham* | 10 | 104,40 | 102,00 | 2415,82 | 49,15 | 0,003* |

Teste de kruskal-wallis; *significativo

Na Tabela 16 faz-se o cruzamento da contagem de PMN no pulmão de ratos com icterícia por 10 dias de duração e submetidos apenas à laparotomia. Fez-se a comparação com animais submetidos à icterícia 10 dias de duração e à LPC por 24h. Demonstra-se que o resultado não apresentou diferença significativa.

TABELA 16 - COMPARAÇÕES DE PMN DOS GEc COM GF

| POLIMORFONUCLEARES | | n | MEDIA | MEDIANA | VARIANCIA | DESV. PADRAO | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GEc | ICTERICIA240/LPC | 5 | 98,40 | 92,00 | 548,80 | 23,43 | |
| GF | ICTERICIA240/*sham* | 10 | 104,40 | 102,00 | 2415,82 | 49,15 | 0,806 |

Teste de kruskal-wallis; * significativo

Na Tabela 17 o resultado da comparação entre animais ictéricos 240h e submetidos à sepse por 24h demonstrou diferença significativa em relação aos animais submetidos à peritonite por injeção intraperitonial de *E. coli* ($GA_1$).

TABELA 17 - COMPARAÇÕES DE PMN DOS $GE_C$ COM $GA_1$

| POLIMORFONUCLEARES | | n | MEDIA | MEDIANA | VARIANCIA | DESV. PADRAO | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GEc | ICTERICIA240/ LPC | 5 | 98,40 | 92,00 | 548,80 | 23,43 | |
| $GA_1$ | *E.coli* 1 | 8 | 116,00 | 124,00 | 1353,14 | 36,79 | 0,003* |

Teste de kruskal-wallis; * significativo

## 4.3.2 COMPARAÇÕES DAS MEDIDAS DO SEPTO ALVEOLAR EXPERIMENTO ICTERÍCIA

Na Tabela 18 observa-se o resultado das comparações do septo alveolar no experimento Icterícia. Nota-se que não ocorreu diferença significativa na medida do septo nos animais submetidos à icterícia 240h e sepse 24h ($GE_c$) e animais submetidos à icterícia por 10 dias e laparotomia (GF) com animais do grupo controle *sham* (GH).

TABELA 18 - COMPARAÇÕES DA MEDIDA DO SEPTO ALVEOLAR DOS GH COM GEc E GF

| SEPTO ALVEOLAR | | n | MEDIA | MEDIANA | VARIANCIA | DESV. PADRAO | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GH | CONTROLE *Sham* | 10 | 10,91 | 10,14 | 7,00 | 2,65 | |
| GEc | ICTERICIA240/ LPC | 5 | 9,19 | 8,89 | 2,50 | 1,58 | 0,178 |
| GF | ICTERICIA240/*sham* | 10 | 13,06 | 11,92 | 14,61 | 3,82 | 0,199 |

Teste de kruskal-wallis; * significativo

Na Tabela 19 observa-se que, quando comparado o grupo que sofreu icterícia por 10 dias e sepse 24h ($GE_c$) com animais com icterícia por 10 dias e laparotomia (GF), apresentou-se diferença significativa em relação à medida do septo alveolar, com maior espessamento quando não havia sepse.

TABELA 19 - COMPARAÇÕES DA MEDIDA DO SEPTO ALVEOLAR DOS GEc COM GF

| SEPTO ALVEOLAR | | n | MEDIA | MEDIANA | VARIANCIA | DESV. PADRAO | *p* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| GEc | ICTERICIA240/ LPC | 5 | 9,19 | 8,89 | 2,50 | 1,58 | |
| GF | ICTERICIA240/*sham* | 10 | 13,06 | 11,92 | 14,61 | 3,82 | 0,050* |

Teste de kruskal-wallis; * significativo

# 5 DISCUSSÃO

Os modelos experimentais são os principais meios de investigação de sepse de origem abdominal. Por meio desses é possível avaliar e controlar estados sépticos desde a sua instalação até o momento de falência dos órgãos e sistemas, podendo-se interferir ou não de diferentes formas ou em diferentes tempos nesse processo.[38,39]

Neste estudo avaliou-se a repercussão que a sepse abdominal causou em pulmões de ratos Wistar submetidos a diferentes modelos experimentais. Foram avaliadas alterações teciduais pulmonares com o objetivo de verificar a presença de infiltrado inflamatório pela contagem de PMN e medida do septo alveolar. Foram utilizados para avaliação modelos experimentais de sepse através de injeção intraperitonial de bactérias e LPC. Estes modelos sofreram intervenções de diferentes modos. Estudos comprovaram que a principal característica na lesão pulmonar aguda é o exsudato neutrofílico e o aumento da permeabilidade alveolocapilar, secundários à liberação de mediadores inflamatórios, responsáveis pelo preenchimento alveolar e do *shunt* pulmonar, o que leva à hipoxemia. Com esse fluxo de células inflamatórias, as proteases são liberadas no tecido pulmonar, causando lesão tecidual. As substâncias reativas de oxigênio, liberadas pelos neutrófilos, contribuem para aumentar a lesão pulmonar.[40,18,12,1,2]

No experimento A os animais foram submetidos à indução de sepse pelos dois métodos relatados anteriormente, sendo comparadas as repercussões pulmonares em ratos submetidos a 24 horas de LPC, 24 horas de injeção intraperitonial de bactérias e um grupo controle submetido apenas à laparotomia (*sham*). Esta avaliação demonstrou que ocorreu infiltração significativa de PMN nos pulmões dos animais sépticos independentemente do método utilizado. Porém, quando avaliada a medida do septo, ocorreu aumento significativo deste parâmetro nos animais submetidos à injeção intraperitonial de bactérias, contudo sem valor significativo nos animais com sepse por LPC. Nos animais submetidos à sepse por 48 horas, por ambos os métodos, ou seja, LPC e injeção intraperitonial de bactérias, não ocorreu diferença significativa no infiltrado PMN dos pulmões, mas no grupo que utilizou a indução de sepse por injeção intraperitonial de bactérias o aumento da

espessura do septo alveolar foi significativo. Os resultados encontrados têm por base estudos que avaliaram as infecções peritoniais, causadas por bactérias gram-negativas e anaeróbias, como a *E. coli*, que é gram negativa e predomina na fase aguda do processo.[41,42]

Ocorreu o aumento significativo de PMN em 24h tanto em animais com sepse por LPC quanto por injeção intraperitonial de bactérias, bem como em animais previamente esplenectomizados e com LPC e também em animais ictéricos por 10 dias com ou sem LPC. A espessura do septo foi significativamente maior em animais do grupo controle em relação àqueles com esplenectomia prévia e com LPC. Os resultados demonstraram que isso pode estar relacionado à ativação do endotélio pulmonar e macrófagos alveolares e intersticiais de moléculas de adesão com a produção de citocinas e quimiocinas, induzindo ao sequestro em massa dos neutrófilos na rede microvascular pulmonar.[32]

Utilizando o método de LPC em ratos esplenectomizados, após 24 horas de sepse houve aumento significativo de infiltrado pulmonar de PMN em relação a animais esplenectomizados submetidos à laparotomia (*sham*). Apresentou-se aumento significativo de PMN em 24h em animais previamente esplenectomizados e com LPC em relação àqueles submetidos à LPC e icterícia 10 dias com LPC, bem como quando comparados com ratos submetidos à sepse por injeção intraperitonial por *E. coli*. Observando-se o resultado da medida da espessura do septo alveolar, também ocorreu aumento significativo em relação ao grupo laparotomia *sham*. Os resultados apontados podem ser comparados aos estudos que comprovam o aumento no índice de mortalidade na ausência do baço, pois essa situação causa depleção nos níveis séricos de opsoninas, substância que estimula a fagocitose, sendo responsável pela suscetibilidade às infecções agudas causadas pelas bactérias.[29,26,30,31,43]

Houve aumento significativo da espessura do septo alveolar pulmonar nos animais esplenectomizados em relação aos ictéricos, ambos com LPC 24h. Os animais com esplenectomia e LPC provocaram mais espessamento do septo em relação à sepse por injeção intraperitonial de *E. coli* após 24h. A esplenectomia total é uma causa de morte em ratos, sendo os ratos machos mais acometidos do que as fêmeas.[29] Em nosso estudo, nos grupos de animais esplenectomizados ocorreu alta

mortalidade. Essa constatação fortalece a indicação de que o baço deve ser preservado sempre que possível.[44,45]

Os animais com icterícia obstrutiva por 10 dias e submetidos à sepse por LPC por 24 horas ou sofrendo apenas laparotomia apresentaram um aumento significativo no infiltrado de PMN quando comparados com ratos que sofreram apenas laparotomia, mas sem estar ictéricos. Contudo, não há diferença em relação à medida do septo entre esses grupos. Avaliando o infiltrado pulmonar PMN entre animais ictéricos, seja com sepse, seja apenas laparotomia, não há diferença significativa, porém houve um aumento significativo do septo alveolar dos animais ictéricos submetidos à laparotomia em relação àqueles com LPC por 24 horas.

Na icterícia obstrutiva a fagocitose dos leucócitos encontra-se deprimida e bactérias entéricas passam para os órgãos extraintestinais.[24,46] A barreira mucosa do intestino, em condições fisiológicas, não permite a passagem de bactérias ou seus produtos para outros órgãos. Quando ocorre quebra dessa barreira, bactérias e endotoxinas passam através do sistema porta, atingindo pulmões e outros órgãos. Na translocação bacteriana para pulmões em animais com ligadura do ducto biliar comum (icterícia obstrutiva) ocorre retardo da eliminação de bactérias por deficiência do sistema reticuloendotelial (SRE), neste caso representado principalmente pelas células de Kupffer do fígado. Assim, os resultados obtidos demonstraram que a icterícia obstrutiva por ligadura do ducto biliar comum em ratos provocou aumento significativo no número de PMN deste órgão, independentemente da associação da icterícia com LPC.[13,47,48,11,12,21]

Em relação à realização da esplenectomia, estudos analisaram que o estado asplênico aumenta a suscetibilidade do paciente para as doenças, como infecções graves, principalmente as de origem séptica fulminante.[49,50,51,52] Tais resultados vêm ao encontro dos dados históricos, como os de Bardach, em 1891, e Morris e Bullock, em 1919, os quais descrevem que, após a esplenectomia, os animais apresentavam peritonite seguida de sepse. Foi apenas com o estudo de King e Shumacker, em 1952, o qual apontou que a esplenectomia causava grave infecção, que a comunidade médica começou a reconhecer a importância do baço, o que também foi comprovado com técnicas correlacionadas e cruzadas de pesquisas.[53]

O infiltrado inflamatório pulmonar por PMN foi significativamente maior em animais esplenectomizados submetidos à LPC por 24 horas em comparação a ratos

com LPC por 24 horas com ou sem icterícia. É conhecido que a sepse fulminante ocorre subitamente e é uma complicação grave que afeta pacientes submetidos a esplenectomia.[54,52,51] Em indivíduos saudáveis que são acometidos por doença aparentemente comum, como amigdalite ou erisipela, a infecção pode se tornar sistêmica, podendo levar à morte em questão de horas ou dias, apesar do tratamento adequado, e os indivíduos imunodeprimidos têm maior risco para essa complicação.[54,45]

A medida do septo alveolar teve aumento significativo nos animais esplenectomizados em relação aos animais ictéricos com LPC, icterícia/sepse e laparotomia, injeção intraperitonial de *E. coli,* esplenectomia/LPC e controle 48h. No pulmão, o primeiro foco a sofrer danos são as células do endotélio vascular, com consequente aumento da permeabilidade vascular, congestão na microcirculação, edema intersticial e diminuição relativa dos espaços intra-alveolares. O aumento da permeabilidade vascular pulmonar origina edema pulmonar, que é causa de alterações da complacência pulmonar, bem como da elastância pulmonar.[55, 7,56]

Ao comparar animais com sepse por injeção intraperitonial de *E. coli* 24 horas e animais ictéricos por 10 dias e submetidos a LPC 24 horas, ocorreu aumento significativo de PMN pulmonar nos animais que receberam bactérias intraperitoniais. Esse fato pode ser justificado pelo método de indução de peritonite escolhido. Quando ocorre a peritonite, as bactérias e seus produtos atingem a circulação sistêmica por via linfática ou hematogênica. Na LPC a peritonite instala-se de maneira gradual e progressiva, levando a um estado séptico hiperdinâmico após algumas horas. Quando este estado de peritonite é induzido pela injeção intraperitonial de bactérias, mesmo dependendo da virulência e da concentração da bactéria escolhida, o estado séptico instala-se de maneira mais rápida e, consequentemente, as repercussões esperadas serão mais intensas.[57,56]

Nesse quadro ocorre depleção circulatória, evoluindo para disfunção de múltiplos órgãos, e a peritonite é consequência desse quadro por via linfática ou hematogênica de um foco remoto de infecção por inoculação, injeção intraperitonial de bactérias, ou, ainda, por mecanismo transmural, ligadura e punção do ceco, podendo levar à sepse abdominal, a um quadro infeccioso do peritônio ou até à morte.[44,47,2,58,59,24,60]

A complexidade da sepse frente à mortalidade não depende apenas do avanço científico e tecnológico dos diagnósticos, da qualidade e quantidade de fatores de agressão induzidos para o dano orgânico, mas também da relação agente-hospedeiro, da resposta imunológica e hemodinâmica do hospedeiro. O reconhecimento precoce dos danos dos sistemas, sinais e sintomas da sepse permitirá que o tratamento seja racional e eficaz. Portanto, novos estudos devem ser desenvolvidos para que os pacientes portadores dessa síndrome tenham melhores resultados nos tratamentos instituídos. Isso depende de pesquisas que esclareçam os diversos mecanismos de lesões orgânicas que ocorrem na sepse.

# 6 CONCLUSÕES

No estudo das células PMN nos pulmões ocorreu aumento significativo em 24h tanto em animais com sepse dos grupos *E.coli*, quanto nos de Esplenectomia e Ictericia.

Nos animais com sepse por injeção intraperitonial de *E. coli*, esplenectomia e ictéricos, ocorreu aumento significativo no do septo alveolar.

Verificou-se que a infiltração de células neutrofílicas e o aumento da permeabilidade capilar do alvéolo, além de características da lesão pulmonar, causam edema do septo, seguido de lesão grave do tecido, independentemente do método de indução de sepse ou dos fatores associados.

# REFERÊNCIAS


1. OBERHOLZER, A.; OBERHOLZER, C., MINTER, RM. et al. Considering immunomodulatory therapies in the septic patient: Should apoptosis be a potential therapeutic target**? Immunol Lett**, n. 75, p.221–224, 2001.

2. BONE CR., GRODZIN, CJ. , ROBERT, AB. Sepsis: a new hypotesis for pathogenesis of the disease process. **Chest**; n.112, p. 235-243, 1997.

3. MATTHAY, AM; ZIMMERMAN, AG; ESMON, C. et al. Future Research Direction in Acute Lung Injury. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 167, p. 1027-1035, 2003.

4. ANGUS DC, LINDE-ZWIRBLE WT, LIDICKER J, CLERMONT G, CARCILLO J, PINSKY MR. Epidemiology of severe sepsis in the united states: analise of incidence, outcome, and associated cost of care. **Crit Care Med**, n. 29, p. 1303-1310, 2001.

5. WARE, LB; MATTHAY, AM. The acute respiratory distress syndrome. **N Engl J Med**, n. 342, p. 1334-1349, 2000.

6. RUNCIE C, RAMSAY G. Intraabdominal infection: pulmonary failure. **World J Surg**. v. 14, n. 2, p. 196-203. 1990.

7. D'ACAMPORA, AJ. ; BERNHARDT, JA.; SERAFIM, JDM.; FARIAS, DC.; TRAMONTE, R. Efeitos da castração pós-natal sobre o tecido pulmonar após sepse experimental de origem abdominal em ratos. **Acta Cir Bras**, v.19, n. 2, p.115-19, 2004a.

8. DIXON, B. The role of microvascular thrombosis in sepsis. **Anaesth Intensive Care**; v. 32, n. 5, p. 619-629, 2004.

9. HUSEYIN, F; ONDER, S., YUCEL, Y., AYNUR, K., ZAFER, C., YUKSEL, E., OGUZ, AO., IRFAN, A. Caffeic acid phenethyl ester reduces mortality and sepsis-induced lung injury in rats. **Crit Care Méd**, v. 35, n. 121, 2007.

10. WANG, XD; AR'RAJAB, A; ANDERSSON, R et al. The influence of sugy cally induced acute liver failure on the intestine in the rat. **Scand J Gastroenterol**, n. 25, p. 10-31, 1993.

11. GARRIDO, GA.; FIGUEIREDO, LFP, ROCHA SM. Experimental models of sepsis and septic shock: na overview. **Acta Cir Brás**, v.19, n. 2, p. 82-88, 2004.

12. MEDEIROS, AC; CARVALHO, MJF; DANTAS FILHO, AM et al. Bacterial translocation to the lung in obstructive jaundice in rats. **Rev. Col. Bras. Cir.** v. n. 2, p. 81-86. 28, 2001.

13. ROCHA, SL; GRECA, FH; PILONETTO, M; BEBER, F; MENDES JÚNIOR, PVF. Translocação bacteriana após obstrução biliar em ratos / Bacterial translocation after biliary obstruction in rats. **Rev. med. Paraná**, v. 62, n. 2, p. 15-18, jul.-dez. 2004.

14. ROCHA, SL. Recuperação em órgãos e tecidos de *Escherichia coli* ATCC 25922, inoculada no íleo terminal de ratos com obstrução intestinal (Tese – Doutorado). Paraná; 1999.

15. DELINGER, RP. Surviving Sepsis Campaign: International guidelines for management of severe sepsis and septic shock. **Crit Care Med**, n. 187538, p. 1-33, jul., 2008.

16. DESPOND, O; PROULX, F; CARCILLO, JA et al. Pediatric sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. **Curr Opin Pediatr**, v.13, n. 3, jun. p. 247-253, 2001.

17. SALLES, MJC.; SPROVIERI, SRS; BEDRIKOW, R et al.Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/sepse - revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia.**Rev Assoc Med Bras**; v. 45, n.1, jan./mar.,p. 86-92.1999.

18. SILVA, E. ;OTHERO, J.; SOGAYAR, ACB. CONSENSO BRASILEIRO DE SEPSE DISFUNÇÃO DE MÚLTIPLOS ÓRGÃOS. **Hospital Albert Einsten**, São Paulo, 2009.

19. BONE, RC; BALK, RA; CERRA, FB et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Crit Care Med**; v. 20, n. 6, p. 864-74, Jun., 1992.

20. AHRENHOLZ DH, SIMMONS RL. Fibrin in peritonitis, beneficial and adverse effects of fibrin in experimental *E. coli* peritonitis. **Surgery**, v. 88, p. 41-47, 1980.

21. CLEMENTS, WD; HALLIDAY, MI; McCAIGUE, MD; et al. The effects of extrahepatic obstructive jaundice on Kupffer cell clearance capacity. **Arch Surg**, v. 128, n. 2, p. 200-203, 1993.

22. ALMEIDA, D; FERREIRA FILHO, PR. **O sistema imunológico na doença parenquimatosa crônica do fígado**. In: FOCACCIA, R. Tratado de hepatites virais, São Paulo, Atneu, p. 421-423, 2002.

23. SILVA JR; CO; CENEVIVA R; RIZZO, CC et al. Alterações hepáticas na icterícia obstrutiva. In: **Simpósio Icterícia Obstrutiva**, n. 30, p. 165-172, abr./jun. 1997.

24. DEITCH, EA. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. **Arch. Surg**, v.125, n. 3, mar. p. 403-404, 1990.

25. DRIVAS, G.; JAMES, O.; WARDLE, N. Study of the reticuloendothelial phagocytic capacity in patients with cholestasis. **Br Med J**, n.1, 1568-1569, 1976.

26. SOUZA, JCL; ATHIÊ, E; MARIGO, C et al. Estudo da regeneração esplênica autóloga e heterotópica em ratos. **Acta Cir Bras**. maio/jun.; n. 20 v. 3, 2005.

27. MARQUES, RG; PETROIANU, A. O papel do baço na resistência à infecção. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 60, n. 5, p. 271-273, 2003.

28. PETROIANU, A; CALDEIRA, DAM; ROCHA, RF et al. Influência da esplenectomia na capacidade física em ratos. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 27, n. 3, São José do Rio Preto, july/Sept.,2005.

29. ALBERTI, LR; ROCHA, RF; CALDEIRA. DAM et al. Mortalidade pós-esplenectomia em modelo animal. **Einstein**, v. 6, n. 2, p. 151-154, nov./jan., 2008.

30. TOUTOUZAS, KG; VELMAHOS, GC.; KAMINSKI, A; CHAN, L; DEMETRIADES, D. Leukocytosis after posttraumatic splenectomy: a physiologicevent or sign of sepsis? **Arch Surg**, n.137, p. 924-928, 2002.

31. FRANCO, CD; SPILLERT, SR; DONOHOE, MJ et al. Effect of splenectomy on acute inflammation. **Am Surg**, v. 6, n. 52, jun., p. 337-339, 1986.

32. CHOW, Chung-Wai; ABREU, MTH, SUZUKI, TS; DOWNEY, GP. Oxidative Stress and Acute Lung Injury Department of Medicine, Division of Respirology, The University of Toronto and The Research Institute,Toronto General Hospital of the University Health Network, Toronto, Ontario, Canada. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 29, p. 427-431 2003.

33. TIMM, LL. Técnicas rotineiras de preparação e **Análise de lâminas histológicas.** Métodos de Estudo em Biologia Caderno La Salle XI, Canoas, v.2, n. 1, p. 231-239, 2005.

34. GARTNER, LP.; HIATT, JL. **Tratado de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

35. STEDMAN'S MEDICAL DICTIONARY. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A, 1996.

36. CALIARI, MV. **Princípios de morfometria digital**: KS300 para iniciantes. Belo Horizonte:Editora da UFMG. 148p, 1997.

37. LEVIN, J. **Estatística Aplicada A Ciências Humanas**. São Paulo: Harbra, 1987.

38. D'ACAMPORA, AJ. **Avaliação histológica da sepse experimental em ratos Wistar** [Tese -Doutorado]. Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina; 1996.

39. SCHRÖDER, J., KAHLKE, V., STAUBACH, KH.; ZABEL, P., STÜBER, F. Gender differences in human sepsis, **Arch Surg,** n. 133, p. 1200-1205, 1998.

40. SNIDER, GL.; LUCEY, EC.; STONE, PJ. Animal models of emphysema. **Am Rev** Respir Dis. n. 133, p. 149-169; In: FUSCO, LB. et al. **Cirurgia de redução do volume pulmonar em modelo experimental de enfisema em ratos**, 1986.

41. CARNEIRO, BGMC, PETROIANU, A, RODRIGUES FHOC, et al. Estudo comparativo entre diversos tipos de tratamento para peritonite fecal em rato. **Rev Col Bras Cir**, n. 29, p. 43-48, 2002.

42. WITTMANN, DH; SCHEIN, M; CONDON, REl. Management of secondary peritonitis. **Ann Surg**, v. 1, n. 224, p. 8-10,1996.

43. SCHULKIND, ML.; ELLIS, EF. ; SMITH, RT. Effect of antibody upon clearence of I - labelled pneumococci by the spleen and liver. **Pediatr Res**. n.1, p.178-184, 1967.

44. CRISPIM, JCO, MEDEIROS, AC., SALES, VSF. Proteção pela glucana em modelo experimental de sepse. **Acta Cir Brás,** v. 19, n. 3. maio/jun., 2008.

45. PETROIANU, A. Aspectos históricos do baço e da cirurgia esplênica. In: PETROIANU, A. **O Baço**. São Paulo: CLR Baliero, 2003.

46. DEITCH, EA, SITTIG, K, BERG, R et al. Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut. **Am J Surg,** v.159, n.1, p. 79-84,1990.

47. KNOBEL, E; BEER, I. Objetivos Hemodinâmicos na Sepse. Disponível em: http://www.praticahospitalar.com.br/pratica%2038/paginas/materia%2023-38.html Acessado em 10 set., 2007.

48. D'ACAMPORA, AJ., ORTELLADO, DK., CARVALHO, ROM., SERAFIM, JDM., FARIAS, DC., Tramonte R. Mucosal atrophy/bacterial translocation in experimental sepsis in Wistar rats. **Acta Cir. Bras.** v.19, n. 5, p. 478-486, Oct, 2004.

49. PETROIANU, A. Cirurgia do baço. In: PETROIANU, A. **Clínica cirúrgica**. Rio de Janeiro: Revinter; 2001.

50. FERRAZ, AP. Complicações cirúrgicas das esplenectomias. In: PETROIANU, A. **O baço**. São Paulo: CLR Baliero, 2003.

51. NORRIS, RP; VERGIS, EN., YU, VL. Overwhelming postsplenectomy infection: a critical review of etiologic pathogens and management. **Infect Med**. n. 13, v. 9, p. 779-783, 1996.

52. COLE, JT; FLAUM, MA. Postsplenectomy infections. **South Med J.** n. 85, v. 12, p. 1220-1226, 1992.

53. SILVA, RG; PETROIANU, A; SILVA, MG et al. Influência das operações sobre o baço na distribuição da *escherichia coli* no sistema mononuclear fagocitário. **Rev. Col. Bras. Cir**. v. 30, n. 1, p. 65-71, Rio de Janeiro, jan./feb., 2003.

54. KING, H; SHUMACKER JR., HB. Splenic studies. **Ann Surg**. n. 136, v. 2, p. 239-242, 1952.

55. GARCIA CSNB, PELOSI P, ROCCO PRM. Sindrome do Desconforto Respiratorio Agudo Pulmonar e Extrapulmonar: Existem Diferencas? **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v. 20, n. 2, Abril/Junho, 2008.

56. ROCHA, SL; KALED NETA, EL; BARROS, CS; SCALCO, RC. Alterações pulmonares e hepáticas na sepse induzida em ratos. In: XIV Seminário de Iniciação Científica e VIII Mostra de Pesquisa da PUCPR, Paraná, 2006.

57. GAUTREAUX, MD; DEITCH, EA; BERG, RD. T-Lynphocytes in host defence against bacterial translocation from the gastrointestinal tract. **Infect Immun**, v. 62, n. 6, p. 2874-2884, 1994.

58. PETROIANU, A; CARNEIRO, BGMC; RODRIGUES, FHOC; ROCHA, RF. Avaliação da reinfecção peritoneal após peritonite fecal em ratos. **Rev. Col. Bras. Cir.** v. 31, n. 2, p. 90-94. 2004.

59. BRESSAN, MCR et al. Prevalence of ecto and endoparasites in mice and rats reared in animals houses. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci**.,v. 34, n. 3, p. 142-146, 1997.

60. SILVA, E. Surviving sepsis campaign: um esforço mundial para mudar a trajetória da sepse grave, **Rev. Bras. Ter. Intensiva.** v.18, n.4, São Saulo oct./dec. 2006.

# ANEXO 1 – EXPERIMENTO A

**Curitiba, 13 de julho de 2007.**
**PARECER N. 71/07/CEUA-PUCPR**

Prezado (a) Professor (a),

Informo a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais, em reunião realizada no **dia 13 de julho** do corrente ano avaliou o Projeto Intitulado "**Comparação da repercussão pulmonar e renal em dois modelos de sepse abdominal**", sob o registro no CEUA /**PUCPR nº 225.**

O experimento classificado como de **categoria C,** será realizado com o número de **40 Ratos Wistar**, os quais após o experimento serão **eutanasiados**

O colegiado do CEPA entendeu que o projeto avaliado está de acordo com as normas éticas vigentes no país e por isso emite o seguinte parecer:

APROVADO COM RECOMENDAÇÕES

**- recomenda-se o uso de um analgésico Opióide, ao invés do indicado Paracetamol,**

Lembramos o senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEPA.

Atenciosamente,

Núcleo de Ética em ... PUCPR

Profª. Gracinda Maria D'Almeida e Oliveira
Presidente do Comitê de Ética no Uso de Animais PUCPR

**Ilmo Sr.**
**Sérgio Luiz Rocha**

## ANEXO 2 - EXPERIMENTO B

**Curitiba, 13 de julho de 2007.**
**PARECER N. 72/07/CEUA-PUCPR**

Prezado (a) Professor (a),

Informo a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais, em reunião realizada no **dia 13 de julho** do corrente ano avaliou o Projeto Intitulado "**Sepse Experimental em Ratos Esplenectomizados**", sob o registro no CEUA /**PUCPR nº 234.**

O experimento classificado como de **categoria C**, será realizado com o número de **40 Ratos Wistar**, os quais após o experimento serão **eutanasiados**

O colegiado do CEPA entendeu que o projeto avaliado está de acordo com as normas éticas vigentes no país e por isso emite o seguinte parecer:

APROVADO COM RECOMENDAÇÕES

**- Padronizar o cronograma do formulário e do projeto.**

Lembramos o senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEPA.

Atenciosamente,

Núcleo de Ética em Pesquisa PUCPR

Profª. Gracinda Maria D'Almeida e Oliveira
Presidente do Comitê de Ética no Uso de Animais PUCPR

## ANEXO 3 – EXPERIMENTO C

Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Curitiba, 02 de dezembro de 2005.
PARECER N 89/05/CEPA-PUCPR

Prezado (a) Pesquisador (a),

Informo a Vossa Senhoria que o Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da PUCPR, em reunião realizada no dia 28 de novembro do corrente ano avaliou o Projeto Intitulado "Avaliação Inflamatória de SEPSE abdominal em ratos Ictéricos", sob o registro no CEPA /PUCPR nº 110

O experimento classificado como de categoria C será realizado com o número de 30 Ratos Wistar, os quais após o experimento serão eutanasiados.

O colegiado do CEPA entendeu que o projeto avaliado está de acordo com as normas éticas vigentes no país e por isso emite o seguinte parecer:

**APROVADO**

Lembramos o senhor (a) pesquisador (a) que é obrigatório encaminhar relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEPA.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Paulo Henrique Couto Souza
Secretário do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais da PUCPR

Ilmo Sr.
Lafayete Barbosa Ramos

This document was created with Win2PDF available at http://www.win2pdf.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.