

SUELENE SUASSUNA SILVESTRE DE ALENCAR

**TRANSLOCAÇÃO DE BACTÉRIAS MARCADAS
COM ^{99m}TECNÉCIO NA ICTERÍCIA OBSTRUTIVA
EXPERIMENTAL EM RATOS**

RECIFE – BRASIL
2000

SUELENE SUASSUNA S. DE ALENCAR

**“TRANSLOCAÇÃO DE BACTÉRIAS MARCADAS COM
^{99M}TECNÉCIO NA ICTERÍCIA OBSTRUTIVA
EXPERIMENTAL EM RATOS”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Cirurgia nível de Mestrado do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador Interno: Prof. ALDO DA CUNHA MEDEIROS

Orientador Externo: Prof. CARLOS TEIXEIRA BRANDT

Pesquisa realizada no Núcleo de Cirurgia Experimental do Departamento de Cirurgia / UFRN.

**RECIFE – BRASIL
2000**

CATALOGAÇÃO NA FONTE

A368t

Alencar, Suelene Suassuna Silvestre de.

Translocação e bactérias marcadas com ^{99m}técnicio na icterícia obstrutiva experimental em ratos / Suelene Suassuna Silvestre de Alencar. – Recife, 2000.

59f. : il.

Orientador: Prof. Carlos Teixeira Brandt

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Centro de Ciências da Saúde. Universidade Federal de Pernambuco.

1. Cirurgia – Tese. 2. Translocação bacteriana – Tese. 3. Sistema Gastrointestinal – Ratos – Tese. 4. Icterícia obstrutiva – Tese. I. Brandt, Carlos Teixeira. II. Título.

RN-UF/BS-CCS

CDU: 617(043.2)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR

Prof. Mozar Neves Ramos

VICE - REITOR

Prof. Geraldo José Marques Pereira

PRÓ - REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Paulo Roberto Freire Cunha

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DIRETOR**

Prof. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS
DIRETOR SUPERINTENDENTE**

Prof. Marcello Jorge de Castro Oliveira

**DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
CHEFE**

Prof. Renato Dornelas Câmara Neto

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA
NÍVEL MESTRADO
COORDENADOR**

Prof. Carlos Teixeira Brandt

VICE - COORDENADOR

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

CORPO DOCENTE

Prof. Carlos Roberto Ribeiro de Moraes

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Cláudio Moura Lacerda de Melo

Prof. Edmundo Machado Ferraz

Prof. Frederico Teixeira Brandt

Prof. Jairo de Andrade Lima

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Nelson Costa Rêgo Caldas

Prof. Ricardo José Caldas Machado

SUELENE SUASSUNA S. DE ALENCAR

**“TRANSLOCAÇÃO DE BACTÉRIAS MARCADAS COM ^{99m}TECNÉCIO NA
ICTERÍCIA OBSTRUTIVA EXPERIMENTAL EM RATOS”**

Banca examinadora

**Prof. Dr. José Lamartine de Andrade Aguiar
Presidente**

**Prof. Dr. Álvaro Bandeira Ferraz
Examinador interno – UFPE**

**Profa. Dra. Maria Goretti Freire Carvalho
Examinadora externa - UFRN**

**A meu esposo François e às minhas filhas
Aurélia, Fernanda e Raíssa, minha eterna
gratidão pela compreensão, apoio e carinho.
Aos meus pais Marlene e Joaquim Filho,
pelo incentivo e apoio.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Aldo da Cunha Medeiros, orientador, mestre e amigo, exemplo de dedicação ao ensino e à pesquisa médica, pelo relevante apoio, orientação criteriosa, ensinamentos e credibilidade na realização deste trabalho.

Ao Prof. Carlos Brandt, Coordenador do Curso de Mestrado da UFPE, pelo esforço na consolidação do convênio interinstitucional entre essa Universidade e a UFRN, o que tornou factível o presente trabalho.

Ao Prof. Valbert Nascimento Cardoso, pelo apoio e incentivo na viabilização deste trabalho, concernente à realização da pesquisa no Laboratório de Radioisótopos da UFMG sobre o processo de marcação das bactérias.

À Prof.^a Simone Odília Fernandes Diniz, pela significativa colaboração na execução deste trabalho no Laboratório de Radioisótopos da UFMG.

Ao Prof. Andy Petroianu, pelo apoio recebido na viabilização da pesquisa realizada na Faculdade de Medicina da UFMG.

Ao Prof. Samir Assi João e Prof. Carlos Alberto de Almeida, colegas do Departamento de Cirurgia da UFRN e companheiros de mestrado, pela amizade e inestimável colaboração dedicada à execução deste trabalho.

À Prof.^a Keyla Borges Ferreira Rocha, pela competência e colaboração criteriosa que dedicou na análise histopatológica deste trabalho.

À Prof.^a Marli Pinheiro da Silva, microbiologista da Faculdade de Farmácia da UFRN, pela colaboração e critério na análise das culturas bacterianas.

À Prof.^a Tereza Neuma de Souza Brito e Prof.^a Zélia Maria de Souza, bioquímicas da Faculdade de Farmácia da UFRN, pela importante colaboração na análise laboratorial.

Ao Prof. Juarez Ferreira da Costa, vice-diretor do CCS/UFRN, pelo apoio recebido pela realização deste curso.

A funcionária do Núcleo de Cirurgia Experimental CCS/UFRN, Maria de Lourdes de Ribeiro de Oliveira (Lurdinha), pela colaboração na realização das cirurgias experimentais desta pesquisa.

Ao funcionário do Núcleo de Cirurgia Experimental CCS/UFRN, Ítalo Medeiros de Azevedo, pela importante colaboração na realização desta pesquisa.

“Sem Integridade a Motivação é Perigosa. Sem Motivação a Capacidade é Impotente. Sem Capacidade a Compreensão é Limitada. Sem Compreensão o conhecimento não tem sentido. Sem Conhecimento a experiência é cega”.

(Dee Hock)

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE QUADROS	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVOS.....	19
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1. TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA E ICTERÍCIA OBSTRUTIVA.....	20
3.2. FISIOPATOLOGIA DA MUCOSA INTESTINAL.....	23
3.3. O PAPEL DA BILE NA MUCOSA INTESTINAL.....	26
3.4. IMUNIDADE DO HOSPEDEIRO	28
3.5. PATOGÊNESE MICROBIANA.....	31
3.6. ISÓTOPO RADIOATIVO.....	32
4 MÉTODOS.....	34
4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS	34
4.2. MARCAÇÃO DAS BACTÉRIAS.....	34
4.3. PROCEDIMENTOS OPERATÓRIOS	35
4.4. MICROBIOLOGIA E ANÁLISE BIOQUÍMICA	35
4.5. PROCESSAMENTO DAS PEÇAS E ANÁLISE HISTOLÓGICA.....	36
4.6. ANÁLISE CINTILOGRÁFICA	37
4.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	38
5 RESULTADOS	39
6 DISCUSSÃO.....	56
7 CONCLUSÃO	59
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
ANEXOS	64

LISTA DE ABREVIATURAS

TB: Translocação bacteriana

NLM: Nódulos Linfáticos mesentéricos

E. coli: Escherichia coli

^{99m}Tc : $^{99m}\text{Tecnécio}$

IO: Icterícia obstrutiva

SRE: Sistema retículo-endotelial

ALT: Alanina aminotransferase

AST: Aspartato aminotransferase

PAL: Fosfatase alcalina

TGI: Trato gastrointestinal

TNF: Fator de Necrose Tumoral

DBP: Ducto biliar principal

LDBC – Ligadura do ducto biliar comum

CPM – Contagem de bactéria por minuto

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Fotomicrografia de corte do fígado do grupo I, coloração HE, (x200).	49
Figura 2: Fotomicrografia de corte do fígado do grupo II, coloração HE, (x200).	50
Figura 3: Fotomicrografia de corte do fígado do grupo I, coloração HE, (x200).	51
Figura 4: Fotomicrografia de corte do fígado do grupo II, coloração Tricrômico de Masson, (x200).....	52
Figura 5: Fotomicrografia de corte do fígado do grupo I, coloração Tricrômico de Masson, (x200).....	53
Figura 6: Fotomicrografia de corte do fígado do grupo I, coloração Tricrômico de Masson, (x200).....	54
Figura 7: Fotomicrografia de corte do baço do grupo I, coloração. HE, (x200).	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição da média mais ou menos desvio padrão da dosagem de bilirrubina para os grupos LDBC e controle.....	39
Tabela 2: Distribuição da média mais ou menos desvio padrão da dosagem de bilirrubina em ratos submetidos a LDBC + ^{99m}Tc – E. Coli para os grupos	39
Tabela 3: Distribuição da média mais ou menos desvio padrão dos níveis de AST, ALP, PAL para os grupos icterico e controle	39
Tabela 4: Distribuição da média mais ou menos desvio padrão dos níveis de AST, ALP, PAL para os grupos icterico e controle em ratos submetidos LDBC + ^{99m}Tc – E. Coli	40
Tabela 5: Distribuição da média mais ou menos desvio padrão da coloração HE para os grupos LDBC e controle	41
Tabela 6: Distribuição da média mais ou menos desvio padrão da coloração Tricrômico de Masson para os grupos LDBC e controle	41
Tabela 7: Distribuição da média mais ou menos desvio padrão da captação de ^{99m}Tc – E. Coli (%) pelo linfonodo, baço, fígado e pulmão para os grupos controle e icterico	42
Tabela 8: ANOVA para captação de ^{99m}Tc – E. Coli (CPM).....	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: ANOVA por postos de Kruskal-Wallis para variável dosagem de bilirrubina.....	43
Quadro 2: ANOVA por postos de Kruskal-Wallis para variável dosagens bioquímicas	43
Quadro 3: ANOVA por postos de Kruskal-Wallis para variável translocação de bactérias.....	43
Quadro 4: ANOVA por postos de Kruskal-Wallis para variável imagens por campo através da coloração HE	43
Quadro 5: ANOVA por postos de Kruskal-Wallis para variável imagens por campo através da coloração Tricrômico de Masson	43

RESUMO

Estudo realizado com o objetivo de avaliar a translocação bacteriana (TB) do trato gastrointestinal para órgãos viscerais em ratos submetidos à ligadura do ducto colédoco e submetidos à administração por via oral (gavagem) de *E.coli* marcada com ^{99m}Tecnécio (^{99m}Tc-*E.coli*). Quatro grupos de ratos foram estudados: grupo I (n=10) ligadura do colédoco, grupo II (n=10) controle ou “sham operation”, grupo III (n=12) ligadura do colédoco e gavagem com ^{99m}Tc-*E.coli* e grupo IV (n=5) controle ou “sham operation” e gavagem com ^{99m}Tc-*E.coli*. Usando técnica asséptica e sob anestesia, os ratos foram submetidos à laparotomia. Nos ratos dos grupos I e III realizou-se ligadura do colédoco com fio de seda nº 3 zeros e nos ratos dos grupos II e IV apenas manipulação do colédoco com pinça de Adison (sham operation). Após sete dias de observação, os animais dos grupos I e II foram mortos e ressecados fígado, baço, linfonodos mesentéricos e pulmões para exame microbiológico (meios Agar-sangue e Agar Mac Conkey) e exame histopatológico (coloração H.E. e Tricrômico de Masson) por análise morfométrica. O nível de bilirrubina nos grupos ictericos foi elevado em relação aos do grupo controle. A incidência de bactérias translocadas foi maior no grupo I comparada ao controle $p < 0,05$. Nos animais dos grupos III e IV, após sete dias de observação, foi administrada por via oral (gavagem) ^{99m}Tc-*E.coli* e após 24 Hs, os ratos de ambos os grupos foram mortos e seus órgãos retirados para contagem da radioatividade em cintilador gama. Os resultados não mostraram diferença estatisticamente significativa na captação da *-E.coli* entre os dois grupos ($p < 0,05$). Porém a análise das interações grupo x órgão mostrou diferença entre os grupos icterico e controle para os órgãos: fígado e pulmão. Os dados disponíveis permitem concluir que em ratos ictericos por ligadura do

colédoco ocorreu translocação de bactérias detectáveis por exame microbiológico. Não ocorreu translocação de bactérias com ^{99m}Tc no modelo proposto.

ABSTRACT

This study was designed to evaluate the bacterial translocation (TB) from the gastrointestinal tract to visceral organs in rats submitted to laparotomy and common bile duct ligation (CBDL). Four groups of rats were studied: group I (n = 10) CBDL; group II (n=10) control or “sham operation”; group III (n= 12) CBDL and 99mTc-E.coli and group IV (n=5) control or “sham operation” e 99mTc-E.coli. All the animals were operated with aseptic technic under intraperitoneal anesthesia with pentobarbital sodium (200mg/Kg). On 7th postoperative day the animals of groups I and II were killed with a letal dosis of anesthetic and the liver, spleen, mesenteric lynfonodes and lungs were ressected to microbiological (Agar-blood and Agar-Mac Conkey) and histological examination (H.E. and Masson Trichromic) through morphometric analysis. On 7th postoperative day the animals of III and IV groups were submitted to 99mTc-E.coli gavage and after 24 hr they were killed and their organs were ressected. After that, the bacterial radioactivity was mensured through an Automatic count of Gama Radioative – model ANSR (Abott Laboratories). The bilirrubin levels of the jaundiced rats were elevated compared with the control groups. The incidence of bacterial translocation was higher in group I compared with control group ($p \leq 0,05$). The results showed no significant differences among the jaundiced and control groups to the liver and lungs. The data allow to conclude that in jaundiced rat with ligated bile duct occurred bacterial translocation through microbiological analyses. The model proposed showed no bacterial translocation by the labeled 99mTc technic.

1 INTRODUÇÃO

A translocação bacteriana (TB) é reconhecida como sendo o mecanismo de passagem de bactérias viáveis e endotoxinas do intestino para linfonodos mesentéricos ou órgãos distantes¹. Os microorganismos, uma vez que tenham atravessado a barreira epitelial, situam-se na cavidade peritoneal, dando origem à peritonite ou à metastatização para diferentes órgãos como pulmões, baço ou outros sítios² promovendo a sepse de origem intestinal em pacientes gravemente enfermos e imunocomprometidos³. Este fenômeno tem sido avaliado em modelos experimentais, onde a quantificação de bactérias presentes nos nódulos linfáticos mesentéricos (NLM), fígado, baço e pulmões é determinada principalmente por técnicas de cultura microbiana⁴. Os principais microorganismos encontrados nesses órgãos correspondem aos bacilos gram-negativos aeróbicos e anaeróbicos facultativos, sendo a *Escherichia coli* (*E. coli*), a bactéria mais freqüentemente encontrada⁵.

Estudos empregando bactérias marcadas com isótopos radioativos foram realizados com a finalidade de demonstrar o fenômeno da TB em modelos experimentais de injúria térmica⁶, choque hemorrágico⁷, icterícia obstrutiva⁸ e peritonite química⁹.

Vários estudos empregando partículas não bacterianas, como microagregados de albumina, carbono coloidal e sulfeto coloidal, marcadas com ^{99m}tecnécio (^{99m}Tc), foram realizados para avaliar o sistema mononuclear fagocitário, baseados tanto na depuração sanguínea dessas partículas quanto na captação das mesmas pelos NLM, fígado, baço e pulmões^{10,11}. A TB do intestino tem sido relatada por ocorrer sobre uma variedade de condições tais

como, injúria térmica¹², choque hemorrágico¹³, trauma¹⁴, endotoxemia⁵ e uso de nutrição parenteral total¹⁵.

Alguns estudos mostraram que ocorre passagem de endotoxinas da luz intestinal para a circulação portal em indivíduos ictericos, bem como de bactérias através da barreira mucosa para órgãos como fígado, baço, pâncreas, NLM e rins^{1,5,16}.

Os estudos sobre a TB têm discutido amplamente o mecanismo através do qual ocorre a passagem da bactéria ou endotoxina do lúmen intestinal para linfonodos mesentéricos, órgãos à distância e corrente circulatória. Von Gierke propôs dois eventos que poderiam facilitar o movimento de bactérias na TB. Um denominado via intrínseca, auxiliado pela captação celular e outro, baseado no transporte de bactérias através da parede intestinal em células fagocíticas até os linfáticos regionais¹⁷.

Apesar do aprimoramento da técnica operatória e do desenvolvimento de sucessivas gerações de antibióticos, a infecção e endotoxemia continuam como as principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com icterícia obstrutiva (IO).

2 OBJETIVOS

Com base nestes conhecimentos, este estudo tem como objetivos:

1. Analisar o fenômeno da TB para fígado, baço, linfonodos mesentéricos e pulmões em modelo experimental de ictecícia obstrutiva em ratos.
2. Avaliar a captação da *E. coli* marcada com ^{99m}Tc pelos órgãos acima citados.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. TRANSLOCAÇÃO BACTERIANA E ICTERÍCIA OBSTRUTIVA

O aparecimento de icterícia decorre de distúrbios do metabolismo da bilirrubina ou modificações que se estabelecem ao fluxo biliar. A icterícia é caracterizada por elevação nos níveis séricos de bilirrubina e clinicamente expressada por coloração amarelada das escleróticas, mucosas, pele e líquidos orgânicos. Portanto, a bilirrubina é usada como indicador de disfunção hepatobiliar, sendo capaz de quantificar a icterícia¹⁸.

A bilirrubina é o produto final do catabolismo da hemoglobina em sua quase totalidade (80% a 85%) com apenas uma pequena fração sendo derivada de outras hemoproteínas. Aproximadamente 300mg de bilirrubina são formadas diariamente. A produção da hemoglobina ocorre no interior das células do sistema retículo-endotelial (SRE), sendo liberada dos eritrócitos envelhecidos pela ação dos macrófagos teciduais e é desdobrada em globina e heme¹⁹. O anel da parte heme sofre a ação da heme-oxigenase, originando a biliverdina que é rapidamente reduzida pela biliverdina-redutase, transformando-se em bilirrubina. Esta bilirrubina, denominada de bilirrubina não conjugada (bilirrubina indireta), liga-se à albumina e é transportada ao fígado onde é conjugada com o ácido glicurônico por ação da enzima glicuranyl transferase sendo então, excretada para dentro dos canalículos biliares sob a forma de bilirrubina direta. No intestino, cerca da metade da bilirrubina conjugada é convertida por ação bacteriana, em urobilinogênio. Cerca de 20% deste composto é reabsorvido no intestino e entra na circulação êntero-hepática e pequenas quantidades são

excretadas pela urina. A oxidação do urobilinogênio forma a urobilina que é excretada através das fezes²⁰.

A icterícia é classificada em três tipos: pré-hepática, hepática e colestática. A icterícia por hiperbilirrubinemia indireta compreende a icterícia fisiológica do recém-nascido, forma mais comum deste tipo de icterícia, ocorrendo devido a um aumento temporário de bilirrubina como consequência de hemólise dos eritrócitos, e também devido a baixos níveis de glicuroniltransferase na primeira semana de vida. Outras causas são a Síndrome de Crigler-Najjar, do tipo I e tipo II, e a síndrome de Gilbert, caracterizadas pela redução ou ausência de atividade da enzima glicuranyltransferase. A icterícia por hiperbilirrubina direta compreende as colestases intra-hepáticas e extra-hepáticas. As intra-hepáticas ocorrem nas cirroses, hepatites alcoólicas e virais. Dentre as colestases extra-hepáticas pode-se destacar a icterícia obstrutiva, causada por obstrução dos ductos biliares, que tem como principais causas, o bloqueio do ducto colédoco por cálculo biliar, estenose ou carcinoma de cabeça de pâncreas e de vesícula¹⁹.

A análise sérica das bilirrubinas é feita através da reação com o ácido sulfanílico diazotado (reagente de Ehrlich), conhecida como reação de Van den Bergh. A bilirrubina conjugada é um composto polar, hidrossolúvel, que reage diretamente com o reagente de Ehrlich, sendo classificada como bilirrubina direta. A bilirrubina não conjugada, bilirrubina indireta, é um composto apolar e lipossolúvel que reage com o reagente de Ehrlich apenas em presença de solubilizantes. Na avaliação das doenças hepatobiliares, as dosagens de enzimas como a alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (PAL) auxiliam no diagnóstico. As enzimas

aminotransferases têm distribuição em vários tecidos, principalmente em fígado, coração e músculos esqueléticos. A ALT tem distribuição semelhante, porém sua concentração maior é no fígado. A fosfatase alcalina está presente no fígado, vesícula biliar, ductos biliares e medula óssea. O aumento da sua atividade ocorre principalmente nas obstruções biliares, sendo esta a base de sua aplicabilidade clínica.

Pacientes com IO têm uma maior susceptibilidade em desenvolver infecção e endotoxemia. Na icterícia obstrutiva, a função das células de Kupffer está deprimida, prejudicando a fagocitose e a estase biliar propicia a proliferação de bactérias⁴.

Culturas de bile de pacientes submetidos à cirurgia biliar mostrou que a incidência de bactérias isoladas foi de aproximadamente 30%, variando com a idade do paciente, com o tipo de cirurgia (urgência ou eletiva) e com a existência de obstrução biliar. A incidência de endotoxemia variou de 50% a 75% nos pacientes operados por icterícia obstrutiva²¹.

Coube e Berg e Garlington descreverem o fenômeno que denominaram translocação bacteriana, como a passagem de germes viáveis do tracto gastrointestinal (TGI) para sítios extra-intestinais estéreis, tais como linfonodos mesentéricos, baço, fígado, rins, cavidade peritoneal e corrente sanguínea¹. Muitos destes germes são destruídos pelo sistema de defesa, após ultrapassarem a barreira mucosa, e muitas vezes não chegam a ser identificados².

A ausência de bile no intestino é reconhecida como sendo o fator primário responsável pelo aumento nos níveis de endotoxina no sangue portal nesses pacientes²². Embora essa teoria seja aceita pela maioria dos autores, é

consenso geral que a endotoxemia ocorre como resultado da falência do sistema fagocitário hepático em eliminar a grande quantidade de endotoxina que migra do intestino para a circulação portal⁸.

Deitch *et al* propuseram três mecanismos promotores da translocação bacteriana: (1) Disfunção da microflora intestinal nativa, resultando num aumento do crescimento de bacilos gram-negativos; (2) Injúria física na mucosa intestinal e (3) Perda da imunidade do hospedeiro³.

3.2. FISIOPATOLOGIA DA MUCOSA INTESTINAL

Aceita-se que a mucosa do trato digestivo, além de papel secretório e absorptivo, constitui também importante sítio imunológico e metabólico²³. Em decorrência de barreira intestinal intacta, das defesas imunológicas capazes e da microflora normal do tracto gastrointestinal, que evitam a superpopulação de patógenos, especialmente os bacilos entéricos, não ocorre passagem maciça de germes intestinais para outros órgãos²⁴. O intestino é um dos maiores órgãos de defesa imunológica do corpo e, associado aos tecidos linfáticos mesentéricos, contem aproximadamente 40% do total de células imunes efetivas²⁵.

Apesar do sistema portal ser considerado o principal sistema de drenagem de endotoxinas ou bactérias do intestino para o fígado, os nódulos linfáticos mesentéricos atuam como rota alternativa de passagem destes²⁶.

A flora bacteriana intestinal e a grande quantidade de endotoxinas, em condições normais, são capazes de evitar a TB como também, prevenir a colonização de bactérias oportunistas ou exógenas. Este fenômeno, conhecido como antagonismo bacteriano, impede o crescimento de bactérias exógenas por competir com os nutrientes ao nível de sítios de adesão nos enterócitos²⁶.

Embora estudos clínicos e experimentais tenham demonstrado o papel da barreira intestinal na promoção da TB, o mecanismo pelo qual ocorre a translocação permanece desconhecido²⁷.

Evidências histológicas de injúria da mucosa intestinal, como edema subepitelial e descolamento do epitélio da lâmina própria envolvendo as vilosidades ileais foram observadas por Deitch *et al*³. Além de edema subepitelial, dilatação de vasos linfáticos e infiltrado inflamatório na parede intestinal de ratos ictéricos foram observados por Ding *et al*⁸.

Ding *et al* demonstraram em estudos com microscopia eletrônica, edema de lâmina própria com membrana epitelial íntegra no intestino delgado em ratos com IO tratados com solução salina. A microscopia eletrônica de transmissão revelou que a bactéria foi ativamente aprisionada no interior do enterócito, com perda da continuidade da microvilosidade na borda de escova. Não foi observado envolvimento da bactéria por estruturas membranosas, indicando que o aprisionamento é um processo diferente da clássica fagocitose. A bactéria uma vez chegando até a lâmina própria, onde provavelmente atinge a rota linfática é fagocitada e morta pelos macrófagos da submucosa. No grupo de ratos tratados com MTP-PE (muramyl tripeptídeo fosfatodietanilamina), um potente agente estimulador dos macrófagos, os autores observaram além de uma significativa redução da incidência de TB como também uma melhora sistêmica da função do sistema retículo-endotelial²⁸.

Katayama *et al*, em estudos em ratos observaram que a aderência bacteriana à superfície mucosa intestinal é um importante fator na TB e que o muco intestinal modula essa aderência. Estando os níveis elevados de bactérias,

associados ao aumento do muco intestinal, leva a uma disfunção da barreira intestinal provocando a TB²⁹.

Pacientes com IO têm uma maior susceptibilidade em desenvolver infecção e endotoxemia, como tem sido verificado por diversos autores^{3,5,7}. Alguns estudos têm mostrado que ocorre passagem de endotoxinas da luz intestinal para a circulação portal no indivíduo icterico e estima-se que há passagem de bactérias através da barreira mucosa para órgãos como fígado, baço, NLM, pâncreas, rins e pulmões^{3,30}.

A endotoxina parece estar intrinsecamente relacionada à TB. Em pacientes submetidos a operações de grande porte, ocorre aumento nos níveis de endotoxina endógena no período peri-operatório⁴. Em pacientes ictericos ela encontra-se cronicamente elevada⁴.

Kocsar e Bartok mostraram que a ausência de bile intraluminal em pacientes com IO resultou no aumento da absorção de endotoxinas para a circulação portal³¹.

Na IO a ação da endotoxina inclui efeito direto nos enterócitos, indução de citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF) e inibição ou inativação da xantina dehidrogenase, ativação de radicais oxigenados que promovem lesão direta na mucosa intestinal²².

A endotoxemia é relativamente comum em pacientes imunocomprometidos ou traumatizados e pode afetar a integridade da mucosa intestinal, aumentando a permeabilidade vascular e deprimindo o sistema de defesa imunológico da superfície mucosa⁵.

Estudo realizado por Fenella *et al* usando o teste da lactulose-manitol para avaliar os efeitos da icterícia colestática na função da barreira intestinal em

pacientes ictericos, mostrou que a permeabilidade intestinal foi marcadamente aumentada quando comparada com o grupo controle. Na avaliação imunohistoquímica foi observado um significativo aumento das células T (CD30 e CD68) e expressiva ativação do HLA-DR nas células mononucleares da lâmina própria e nos enterócitos, comparado ao controle, sugerindo ativação imunológica²⁵.

A motilidade intestinal também exerce importante papel na função da barreira intestinal. Segundo Armstrong *et al*, os sais biliares inibem as contrações ileais *in vitro*³². O aumento da TB pode ser causado pela alteração na motilidade intestinal, devido à estase, pela ausência de bile no lúmen intestinal³³.

Um outro possível fator na promoção da TB é a ausência da IgA secretória no intestino. A IgA secretória é um importante componente da defesa imune no lúmen intestinal e na superfície mucosa, normalmente prevenindo a aderência de bactérias Gram negativas na superfície mucosa³⁴. E na presença de ligadura do DBP a IgA secretória está reduzida no intestino³.

3.3. O PAPEL DA BILE NA MUCOSA INTESTINAL

A bile é um complexo fluido composto de água, ácidos biliares, lecitina e outros fosfolipídeos, colesterol, bilirrubina conjugada, IgA secretória, eletrólitos, muco, produtos do metabolismo hepático, drogas e seus metabólitos³⁵.

A bile é secretada pelo fígado de modo contínuo, para os capilares biliares, através dos pólos biliares dos hepatócitos, no interior dos ductos hepáticos e, daí, para o duodeno. Em decorrência de obstrução a esse fluxo biliar, ocorre aumento da pressão endocolédociana. Aumentos subsequentes determinarão dilatação da árvore biliar, com escape de bile do seu interior para

o interstício hepatocanalicular, devido à ruptura dos canalículos biliares que se estabelece. A concentração de sais e ácidos biliares aumenta no interior do hepatócitos e no plasma, provocando a icterícia³⁶.

Os ácidos biliares existentes na bile estão representados pelos ácidos cólico e quenodesoxicólico, denominados primários e os ácidos litocólico e desoxicólico, secundários, respectivamente originários dos primeiros pela ação da flora bacteriana intestinal. Os ácidos biliares permitem a emulsificação, hidrólise e absorção de gorduras. Alguns deles são desconjugados e desidroxilados no delgado e absorvidos por difusão passiva. Os sais biliares conjugados são absorvidos ativamente pelo íleo terminal, fechando o circuito êntero-hepático.

A secreção de bile é proporcional à quantidade de ácidos biliares oferecida aos hepatócitos, e a sua quantidade é o somatório dos ácidos biliares neoformados e dos que retornam ao fígado através do sistema portal³⁶.

O componente da bile que influencia na TB permanece ainda desconhecido; ambos, sais biliares e IgA secretória parecem ser importantes¹⁰. A IgA secretória está reduzida no intestino na presença de ligadura do ducto biliar comum³.

A ausência de bile intra-luminal parece ser a responsável pelos distúrbios na função da barreira intestinal, por aumentar a permeabilidade da mucosa²⁵.

Os sais biliares exercem papel de detergentes por formarem agregados micelares com moléculas de endotoxinas intraluminares³⁷. A ausência destes no lúmen intestinal em pacientes com IO, resulta no aumento da absorção de endotoxinas para a circulação portal^{31,22}.

Estudo de Cahill *et al* mostrou que a incidência de endotoxemia portal pode reduzir de 55% a 0% com a administração oral pré-operatória de ácido desoxicólico, mas o mesmo efeito não foi observado com o uso do ácido quenodesoxicólico²².

3.4 IMUNIDADE DO HOSPEDEIRO

O sistema retículo-endotelial é formado por macrófagos localizados principalmente em fígado, baço, pulmões e medula óssea, sendo responsável pela seqüestração e eliminação de partículas e substâncias tais como, bactérias derivadas do TGI, antígenos celulares, endotoxinas, debris celulares, células tumorais, vírus e parasitas¹⁹.

As células de Kupffer compreendem 90% deste sistema, sendo o maior responsável pelas defesas locais na eliminação de antígenos, endotoxinas e microorganismos derivados do TGI⁴. Está localizado estrategicamente adjacente aos sinusóides hepáticos para executar tais funções específicas, como também a secreção de numerosas substâncias bioativas³⁸.

Em presença de trauma ou septicemia, as células de Kupffer tornam-se ativadas e, como resposta, passam a secretar uma série de fatores tais como, TNF, interleucinas, colagenase, metabólitos do ácido aracdônico, incluindo prostaglandinas¹⁹.

A obstrução do trato biliar pode produzir vários efeitos imunomoduladores potenciais, elevação da pressão dos ductos biliares, hiperbilirrubinemia e altos índices séricos de ácidos biliares¹⁹.

O aumento da pressão dos ductos biliares pode induzir a TB do tracto biliar para a circulação sistêmica e sistema linfático como demonstrou Karsten *et al*³⁹.

Reynolds *et al* em estudos com icterícia obstrutiva em ratos, mostrou que a função dos macrófagos peritoneais está deprimida após sete dias de ligadura do ducto biliar, sugerindo uma relação entre TB e falência dos macrófagos⁴.

Kimmings *at al* defendem a hipótese de que o mecanismo da endotoxemia sistêmica na icterícia obstrutiva deve-se à diminuição da função do sistema reticulo-endotelial do fígado causado pela obstrução biliar⁴⁰.

A endotoxina promove a TB por alteração na imunidade do hospedeiro, como também, por aumento na permeabilidade intestinal⁵. A endotoxina é reconhecida como sendo um indutor da supressão da ativação das células T e interleucina-1.

A captação de bactérias pelas células de Kupffer parece ser feita em duas etapas: extração e excreção, como demonstraram Ding *et al* em estudos em animais com *E. coli* marcada com I¹²⁵ intravenosa⁸. A excreção da *E. coli* degradada dentro do trato biliar pode ser impedida duplamente pelo aumento da pressão ductal e pela obstrução externa na icterícia obstrutiva, sendo a mesma acumulada no fígado, mostrando diminuição na captação na bile quando comparada com animais normais⁴¹.

Na avaliação da função das células de Kupffer, vários métodos têm sido utilizados, tais como; o *clearance* de partículas injetadas, como o carbono coloidal, microagregados de albumina, hemácias marcadas, bactérias marcadas^{8,41,42,43}.

Estudo avaliando a função das células de Kupffer em ratos concluiu que, após uma semana de ligadura do ducto biliar comum, intensa atividade fagocítica foi observada independente da TB³⁸.

Tanaka *et al*¹⁰ observaram uma diminuição da captação de ^{99m}Tc-sulfeto coloidal em fígado de ratos após uma semana de ligadura DBC.

Em trabalhos realizados por Katz *et al*⁴¹, onde *E. coli* marcada com ³⁵S-enxofre foi administrado por via endovenosa, mostraram que após três semanas de ligadura do DBC, o fígado apresentou uma captação diminuída da ³⁵S-*E. coli*, enquanto que os pulmões mostraram um aumento da sua captação. Constataram portanto, que apesar da disfunção hepática, não houve diferença significativa na depuração da ³⁵S- *E. coli* entre os grupos controle e icterícos, sugerindo que os pulmões desses ratos exerceram um mecanismo compensatório, removendo a bactéria da corrente sanguínea. Por outro lado, esses pesquisadores observaram também que no grupo de ratos com sete dias de icterícia não houve diferença significativa na captação da ³⁵S- *E. coli* pelos órgãos.

Megison *et al* observaram uma redução na captação de *E. coli* marcada com ⁷⁵Selênio pelo fígado, aumento na captação pulmonar e nenhuma diferença na captação pelo baço após três semanas de obstrução biliar. Após a coledocoduodenostomia, a captação hepática e pulmonar retornou aos valores dos animais controle⁴³.

Estudo empregando administração endovenosa de microagregado de albumina marcada com ¹²⁵I em 30 pacientes com icterícia obstrutiva mostrou uma significativa depressão da função fagocitária desses pacientes em relação

aos controles. Também foi observada uma correlação significativa entre a função fagocitária e níveis plasmáticos de bilirrubina⁴⁴.

3.5. PATOGÊNESE MICROBIANA

O cólon é o maior reservatório de bactérias gram-negativas. *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus* e *Pseudomonas* apresentam maior potencial de translocação (89%) do que bactérias facultativas, como *Lactobacilos*, *Staphylococcus* e *Enterococcus* (43%)^{1,3,4,45}.

Ravin e Fine⁴⁶ em 1960 postularam, baseados em estudos em humanos e experimentais, ser o intestino fonte de endotoxemia em uma série de desordens sépticas e não-sépticas.

O reconhecimento de que a população anaeróbica do intestino distal é de fundamental importância na limitação da colonização intestinal por bactérias potencialmente patogênicas foi proposto por Waaig na década de setenta (apud⁴⁵).

A partir daí, estudos mostraram que uma flora bacteriana intacta poderia limitar a TB do intestino para linfonodos mesentéricos e para órgãos à distância, como também qualquer fato que alterasse essa flora, como uso de antibióticos, uso de nutrição parenteral total, uso de quimioterápicos, conseqüentemente iriam alterar a homeostase intestinal, tornando o hospedeiro mais susceptível à translocação e à infecção^{47,48}.

Em condições normais, a população bacteriana local é capaz de manter em equilíbrio a flora intestinal normal, contribuindo como mecanismo de defesa intestinal e prevenindo a TB. Este processo, conhecido como antagonismo bacteriano, deve-se ao fato da flora bacteriana competir por nutrientes e pontes

de adesão nos enterócitos, como também produzirem fatores inibidores de crescimento de bactérias exógenas²⁶.

Vários autores têm demonstrado haver correlação entre a incidência de TB para linfonodos mesentéricos e crescimento bacteriano cecal na icterícia obstrutiva em ratos^{1,3,8,45}.

Embora a migração de gram-negativos esteja mais comumente associada à translocação, cocos gram-positivos também apresentam capacidade de migração transintestinal².

3.6. ISÓTOPO RADIOATIVO

O ^{99m}Tecnécio é um radionuclídeo artificial originado da desintegração radioativa de um elemento radioativo (⁹⁹molibdênio), isótopo proveniente da fissão nuclear do urânio, descoberto em 1937 por Segrè & Perrier⁴⁹.

O gerador de ^{99m}Tecnécio consiste de uma coluna de vidro onde o radionuclídeo ^{99m}molibdênio, denominado de pai, encontra-se fortemente adsorvido em uma resina de alumínio. Por um processo de desintegração radioativa, emissão de radiação β , o radionuclídeo pai sofre transmutação e dá origem ao átomo de ^{99m}Tecnécio, denominado de radionuclídeo filho. Os átomos de ^{99m}Tecnécio são eluídos do gerador com solução de cloreto de sódio 0,9% na forma de pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$), e acrescidos de um agente redutor como o cloreto estânico (SnCl_2) para reduzir o ^{99m}Tecnécio⁵⁰.

Por apresentar características como baixo custo, alta disponibilidade, tempo de meia-vida curto, em torno de seis horas, emissão de radiação gama (γ) e energia de radiação (140 Kev), tornou-se o isótopo mais utilizado na marcação de radiofármacos em Medicina Nuclear⁵¹.

Com relação à utilização do ^{99m}Tc em estudos com bactérias marcadas, pode-se destacar a *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Salmonella abortusovis*^{52,53,54}.

O provável mecanismo de marcação das bactérias é devido ao fato do ^{99m}Tc , por ser um metal deficiente em elétrons, reagir com grupos doadores de elétrons como aminas, amidas, tióis, sulfidrilas, isonitrilas, etc. E, no caso específico das bactérias, reagir com estruturas protéicas, já que estas possuem grupos doadores de elétrons. Essa reação pode ocorrer com proteínas da parede celular das bactérias e/ou com as proteínas citoplasmáticas⁵³.

4 MÉTODOS

4.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 37 ratos adultos Wistar pesando 310 ± 25 g. Os animais receberam água e dieta *ad libitum* e foram observados em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura e iluminação adequadas.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos. O grupo I (n=10) foi submetido à laparotomia e ligadura do ducto biliar comum. O grupo II (n=10) foi submetido à laparotomia e apenas manipulação do ducto biliar comum “sham-operation”. O grupo III (n=12) foi submetido à laparotomia com ligadura do ducto biliar comum e após sete dias, receberam gavagem com *E. coli* marcadas com ^{99m}Tc . O grupo IV (n=5) “sham-operation” e submetido à gavagem com *E. coli* marcadas com ^{99m}Tc .

4.2. MARCAÇÃO DAS BACTÉRIAS

O Processo de marcação da *E. coli* foi realizado conforme método descrito por Diniz⁵⁰. De uma cultura de *E. coli* (ATCC-10536) fornecida pelo Laboratório de Controle de Qualidade Biológico da Faculdade de Farmácia da UFMG, crescida durante 18 horas a 37°C, foi retirada uma alíquota de 0,1 ml e adicionada em 10 ml de caldo de soja tripticaseína e mantida a 37°C por 4 horas. Após esse período, amostras de 2,0 ml da suspensão bacteriana foram adicionadas a diferentes concentrações de cloreto estanoso de 40, 130, 290, 400 e 580 μM e incubadas por diversos tempos de incubação (10, 20, 40 e 60 minutos). Após os tempos de incubação, 26,0 MBq de ^{99m}Tc foram adicionados a cada amostra e mantidas a 37°C por mais 10 minutos. Os tubos foram

centrifugados a 3000 rpm por 25 min e uma alíquota de 100 μ L do sobrenadante foi retirada para a determinação da radioatividade. O precipitado foi ressuspendido em 3,0 mL de salina estéril e em seguida retirou-se uma alíquota de 100 μ L para a contagem da radioatividade. Este procedimento foi repetido por três vezes. A porcentagem de ^{99m}Tc incorporado às células bacterianas foi determinada com a utilização da seguinte fórmula:

$$\% \text{ bactérias marcadas} = \frac{\text{cpm (precipitado)}}{\text{cpm (precipitado + sobrenadante)}} \times 100$$

4.3. PROCEDIMENTOS OPERATÓRIOS

Os animais foram anestesiados com Pentobarbital sódico na dose de 20 mg/Kg por via intraperitoneal e operados com técnica asséptica. No grupo I os ratos foram submetidos à laparotomia mediana de 3cm, iniciada a partir do apêndice xifóide, identificação do ducto biliar principal e ligadura do mesmo com fio de seda nº 4 zeros, o mais próximo possível do fígado, para que fosse evitada a lesão do ducto pancreático. Nos animais do grupo II a *porta hepatis* foi identificada e apenas manipulada com pinça de dissecação do tipo Adson “sham-operation”. A parede abdominal foi fechada com dois planos de sutura em pontos separados de monofilamento de nylon nº 4 zeros.

4.4 MICROBIOLOGIA E ANÁLISE BIOQUÍMICA

No sétimo dia de observação os animais de ambos os grupos foram mortos com superdose do anestésico pela via intramuscular. Relaparotomizados com técnica asséptica, uma amostra de 3ml de sangue foi colhida através de punção intracardíaca para dosagens de bilirrubinas, AST, ALT e PAL. Em seguida foram ressecados de cada animal fígado, baço, linfonodos mesentéricos

e pulmões, separando-se metade de cada órgão para exame microbiológico e a outra metade para análise histopatológica. Os fragmentos destinados ao exame microbiológico sofreram processo de homogeneização e foram semeados seletivamente em meio de cultura Agar McConkey para detecção de Gram-negativos e, Agar-sangue para Gram-positivos. As amostras foram incubadas a 37°C e examinadas após 24 e 48 horas.

4.5 PROCESSAMENTO DAS PEÇAS E ANÁLISE HISTOLÓGICA

Os fragmentos para exame histopatológico foram fixados em formaldeído a 10%, incluídos em parafina, cortados em secções de 4µ de espessura e corados pela hematoxilina-eosina e pelo tricrômico de Masson. A análise morfométrica da resposta inflamatória e da fibrose intersticial foi realizada utilizando-se morfometria por imagem. As imagens histopatológicas obtidas nas lâminas coradas pelos métodos acima citados foram analisadas e quantificadas através de Analisador digital que consta de: fotomicroscópio Olympus, Câmera Sony, Computador Pentium III, Windows 98, software Image ProPlus, versão 4.0, Media Cybernetics LP. Os campos microscópicos foram observados com objetiva 20X e ocular 10X cuja imagem foi capturada pela câmera e digitalizada pelo computador, que dividiu os campos microscópicos em unidades de imagem denominadas *picture elements* ou *pixels*. Após selecionada a resolução desejada, os impulsos ópticos foram digitalizados, resultando em uma imagem de cada campo medindo 640X480 *pixels*. Após quantificar os dados histopatológicos em unidades densidade, os resultados foram expressos em µm² e feita a análise estatística.

4.6 ANÁLISE CINTILOGRÁFICA

Nos animais do grupo III e grupo IV foram administrados por sonda gástrica (gavagem), após anestesia inalatória com éter, 0,2 ml de $^{99m}\text{Tc-E. coli}$ (1,6 MBq), após o sétimo dia de icterícia. Em seguida, os animais permaneceram em observação em gaiolas com dieta e água *ad libitum* por 24 horas. Após este período, os animais foram anestesiados e relaparotomizados e amostras de sangue foram coletadas através de punção intracardíaca, para dosagens de bilirrubinas, transaminases e fosfatase alcalina. Logo após, os animais foram mortos com superdose do anestésico por via intramuscular e foram ressecados fígado, baço, linfonodos mesentéricos e pulmões. Um coágulo de 0,5 ml da veia cava inferior foi colhido. Os órgãos após retirados, foram lavados com água corrente e pesados individualmente e colocados em tubos de contagem para a determinação da radioatividade em cintilador Ansr, Abbot. Os resultados foram expressos como porcentagem de captação de $^{99m}\text{Tc-E. coli}$ por minuto (cpm/min) para cada órgão e o cálculo feito de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ captação da } ^{99m}\text{Tc-E. coli} = \frac{\text{cpm órgão/ g tecido}}{\sum (\text{cpm órgão/g tecido})} \times 100$$

Para cada dado considerou-se a média \pm desvio-padrão ($\bar{X} \pm \text{DP}$).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada com a utilização dos softwares STATISTICA 6.0. Para análise dos dados utilizaram-se as técnicas: análise descritiva e a prova não paramétrica de Kruskal – Wallis e paramétrica análise de variância – ANOVA⁵⁴.

Para verificar o que foi observado na análise descritiva exploratória utilizou-se o teste não paramétrico a Prova de *Kruskal - Wallis* (1952) para amostras independentes, livre de distribuição, que tem como objetivo comparar a diferença entre as amostras e verificar se essas diferenças entre as amostras significam diferenças efetivas entre as populações, ou se representam apenas variações casuais, que podem ser esperadas entre amostras aleatórias de uma mesma população⁵⁵.

Para verificar o que foi observado nas análises descritivas utilizou-se a ferramenta estatística análise de variância – ANOVA (Fisher, 1918), que segundo Montgomery tem como objetivo "testar a igualdade de três ou mais médias populacionais, baseado na análise de variâncias amostrais". As observações foram descritas pelo seguinte modelo de efeitos fixos (grupos e órgãos)⁵⁶:

$$Y_{jtk} = \mu + \beta_{t.} + \delta_{.j} + \beta\delta_{tj} + \varepsilon_{tik}$$

Y_{itk} – contagem de bactérias por minutos

Onde:

μ - média geral

$\beta_{t.}$ – grupos, $t=1, 2, 3$

$\delta_{.j}$ – órgãos, $j=1, 2, 3, 4, 5$

$\beta\delta_{tj}$ – grupos x órgãos

ε_{tik} – erros aleatórios

5 RESULTADOS

Todos os animais estudados sobreviveram ao período de observação e ao término de 7 dias, os ratos do grupo I e grupo III submetidos à ligadura do DBP apresentavam-se francamente ictericos. Os níveis séricos de bilirrubinas foram bastante elevados em relação aos dos controles (Tab. 1 e 2).

Tabela 1: Distribuição da média mais ou menos o desvio padrão da Dosagem de Bilirrubina para os grupos

Grupos	Média ± Desvio-Padrão
LDBC	6,77 ± 3,14
CONTROLE	0,37 ± 0,17

Fonte: Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia - CCS/UFRN

Tabela 2: Distribuição da média mais ou menos o desvio padrão da Dosagem de Bilirrubina em ratos submetidos a Ligadura + ^{99m}Tc. – E. Coli para os grupos.

Grupos	Média ± Desvio-Padrão
LDBC	6,57 ± 2,74
CONTROLE	0,32 ± 0,08

Fonte: Laboratório de análises clínicas e toxicológicas da UFMG-B.Horizonte

As dosagens de AST, ALT e PAL apresentaram elevação significativas nos grupos de ratos ictericos comparados com os grupos controle (Tab.3 e 4).

Tabela 3: Distribuição da média mais ou menos o desvio padrão dos níveis de AST, ALT e PAL para os grupos.

Órgãos	Média ± Desvio-Padrão
AST icterico	190,7 ± 77,02
ALT icterico	102,1 ± 51,46
PAL icterico	100,4 ± 28,65
AST controle	29,2 ± 5,20
ALT controle	18,8 ± 4,29
PAL controle	40,5 ± 7,41

Fonte: Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Farmácia - CCS/UFRN

Tabela 4: Distribuição da média mais ou menos o desvio padrão da dos níveis de AST, ALT e PAL em ratos submetidos a Ligadura + ^{99m}Tc. – E. Coli para os grupos.

Órgãos	Média ± Desvio-Padrão
AST ictérico	196,73 ± 65,95
ALT ictérico	94,73 ± 51,84
PAL ictérico	95,10 ± 27,35
AST controle	32,60 ± 2,41
ALT controle	20,80 ± 3,11
PAL controle	52,20 ± 2,05

Fonte: Laboratório de análises clínicas e toxicológicas da UFMG-B.Horizonte

No grupo I onde os ratos foram submetidos à ligadura do DBP, foi observada uma maior incidência de TB comparado ao grupo II (controle) (gráfico 3).

Os NLM apresentaram maior incidência de culturas positivas de bactérias em relação aos demais órgãos. A bactéria cultivada mais encontrada foi a *E. coli*.

O exame histológico dos NLM não apresentou diferença entre os dois grupos I e II. Observou-se em ambos uma linfadenite crônica sem hiperplasia reativa. O mesmo foi observado em cortes de baço entre os dois grupos, que mostrou hiperplasia reativa da polpa branca em graus variáveis de intensidade, congestão da polpa vermelha e impregnação biliar discreta em macrófagos sinusoidais presentes em ambos (Fig.7). O exame dos cortes de fígado dos animais submetidos à ligadura do DBC (grupo I) apresentou alterações bem evidentes, caracterizadas por infiltrado inflamatório portal estendendo-se por vezes aos sinusóides (Fig. 1 e 3), proliferação ductal portal de moderada a intensa, alterações degenerativas de hepatócitos, esteatose, alterações do volume nuclear, presença de figuras de mitose e nucléolos por vezes múltiplos, alterações discretas das células de Kupffer também foram observadas (fig. 5 e

6). Os animais do grupo controle não apresentaram alterações importantes (fig. 2 e 4). Em relação aos pulmões, os animais do grupo I apresentaram áreas focais de espessamento dos septos alveolares, caracterizando uma pneumonite intersticial. A análise morfométrica do fígado dos animais ictericos mostrou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação aos do grupo controle (tab. 5 e 6) (gráfico 4 e 5).

Tabela 5: Distribuição da média mais ou menos da coloração HE para os grupos.

Grupos	Média ± Desvio-padrão
LDBC	26887,88 ± 13315,44
CONTROLE	16944,27 ± 1900,37

Fonte: Departamento de Patologia – CCS/UFRN

Tabela 6: Distribuição da média mais ou menos da coloração Tricrômico de Masson para os grupos.

Grupos	Média ± Desvio-Padrão
LDBC	36974,05 ± 11653,90
CONTROLE	69000,64 ± 26732,36

Fonte: Departamento de Patologia – CCS/UFRN

O estudo realizado nos animais do grupo III e Grupo IV onde foi utilizada a gavagem com a *E. coli* marcada com ^{99m}Tc e retirados os órgãos para a contagem da radioatividade, não apresentou diferença estatisticamente significativa na contagem de bactérias nos órgãos entre os dois grupos (tab. 7).

Tabela 7 Distribuição da média mais ou menos o desvio padrão da captação de ^{99m}Tc – E.Coli (%) pelo linfonodo, baço, fígado e pulmão para os grupos controle e icterico.

Órgãos	Média \pm Desvio-Padrão
Linfonodo icterico	0,13 \pm 0,16
Baço icterico	0,14 \pm 0,18
Fígado icterico	1,74 \pm 1,77
Pulmão icterico	0,25 \pm 0,33
Linfonodo controle	0,13 \pm 0,15
Baço controle	0,15 \pm 0,22
Fígado controle	0,62 \pm 0,54
Pulmão controle	1,52 \pm 2,09

Fonte: Laboratório de Radioisótopos da UFMG – Belo Horizonte no período de 15 a 22 de agosto de 2000.

Como existe interação: grupo x órgão (anexos) estudou-se o que acontece dentro dos diferentes órgãos através da técnica de contrastes ortogonais e concluiu-se de acordo com a ANOVA ao nível de significância de 5%, existe diferença entre os grupos icterico e controle dos órgãos fígado e pulmão (tab. 8) (gráfico 9).

Tabela 8 – ANOVA para a captação de ^{99m}Tc – E. Coli (CPM).

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Quadrado Médio	F	p-valor
Grupos	1	0,919512	0,022411	0,881500
Órgãos	3	0,919512	4,341621	0,007794
Grupos x órgãos	3	0,919512	3,632416	0,017776

Fonte: Pesquisa realizada laboratório de Radioisótopos da UFMG em Belo Horizonte/MG no período de 15 a 22 de agosto de 2000

Quadro 1 – ANOVA por postos de Kruskal-Wallis para a Variável Dosagens de Bilirrubina

	N	Soma dos Postos
LDBC	10	155,0000
Controle	10	55,0000

p =,0001

Quadro 2 - ANOVA por Postos de Kruskal-Wallis para a Variável Dosagens bioquímicas test: H (1, N= 16) = 9,748892 p =,0018

	N	Soma dos Postos
LDBC	11	121,0000
Controle	5	15,0000

Quadro 3 - ANOVA por Postos de Kruskal-Wallis para a Variável Translocação de bactérias test: H (1, N= 20) = 3,554012 p =,0594

	N	Soma dos Postos
Ictérico	10	127,0000
Controle	10	83,0000

Quadro 4 - ANOVA por postos de Kruskal-Wallis para a Variável Imagens por Campo através da Coloração - HE

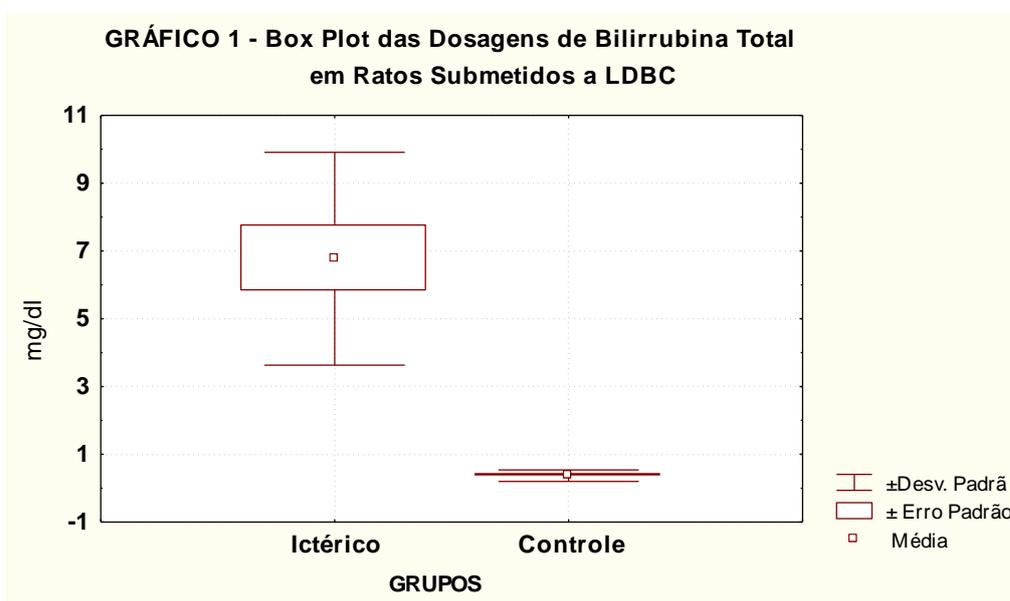
	N	Soma dos Postos
LDBC	10	108,00
Controle	6	28,00

p =0,0126

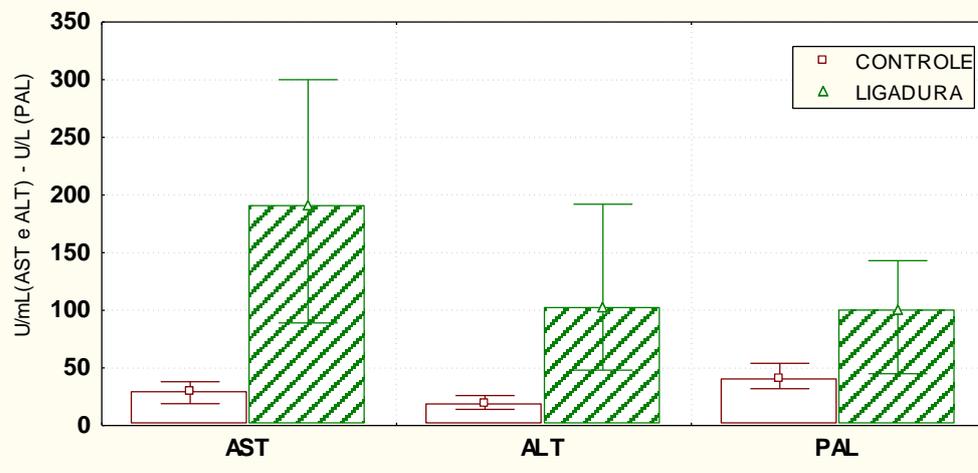
Quadro 5 - ANOVA por postos de Kruskal-Wallis para a Variável Imagens por Campo através da Coloração Tricrômico de Masson

	N	Soma dos Postos
LDBC	9	86,00000
Controle	5	19,00000

p =,0136



**GRÁFICO 2 - Dosagens das Enzimas: Aspartato Aminotransferase (AST)
Alanina Aminotransferase (ALT) e Fosfatase Alcalina (PAL)
em Ratos Submetidos a LDBC**



**GRÁFICO 3 - Box Plot das Incidência de Translocação de Bactérias
para Órgãos segundo os Grupos**

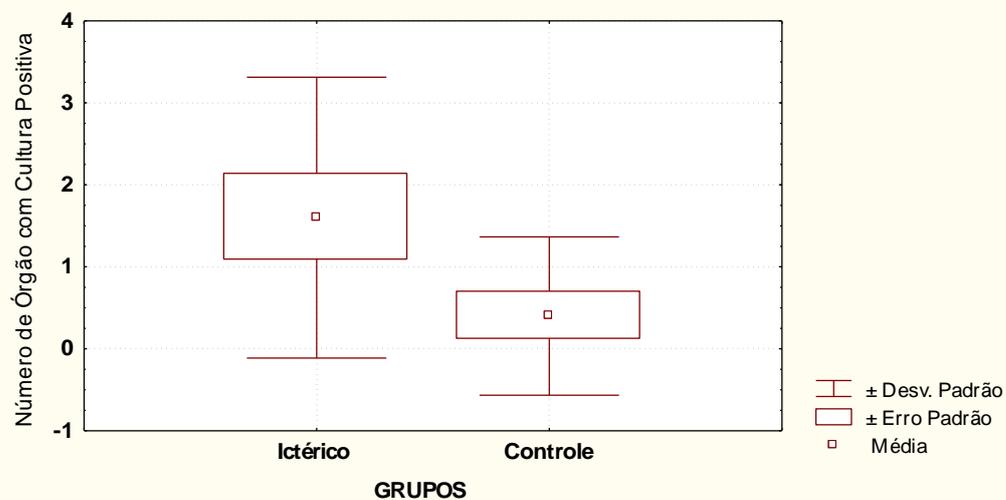


GRÁFICO 4 - Boxplot da Variável Imagens por Campo através da Coloração - HE em Ratos com LDBC

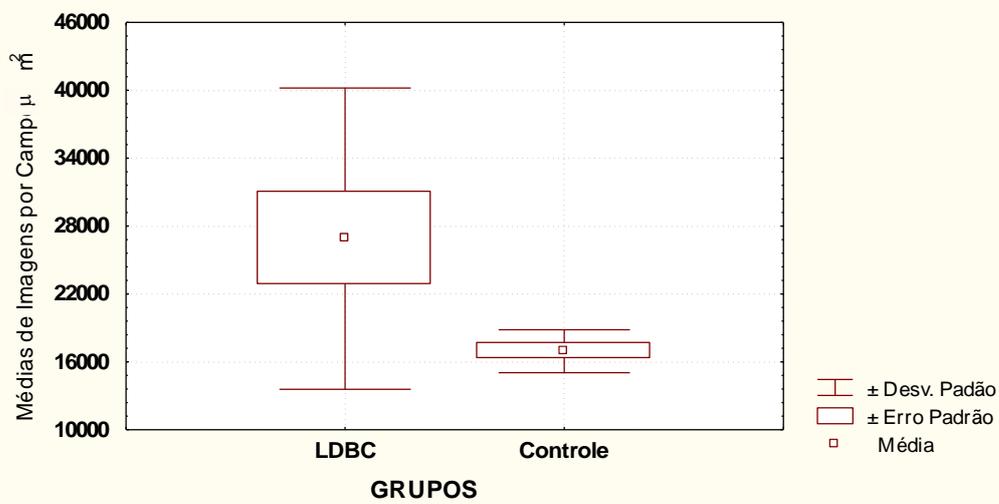


GRÁFICO 5 - Boxplot da Variável Imagens por Campo através da Coloração - Tricrômico Masson

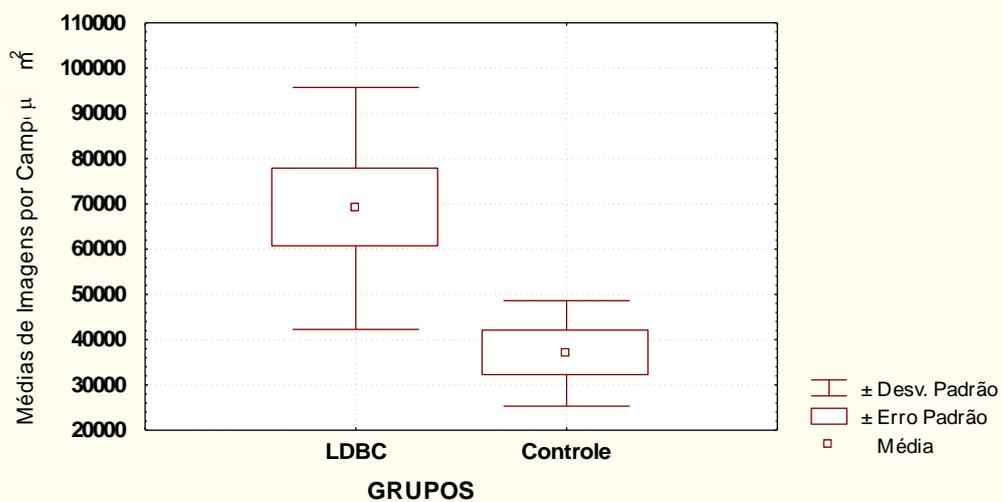


GRÁFICO 6 - Boxplot da Variável Bilirrubina em Ratos Submetidos a LDBC + 99m Tecnécio - E.Coli

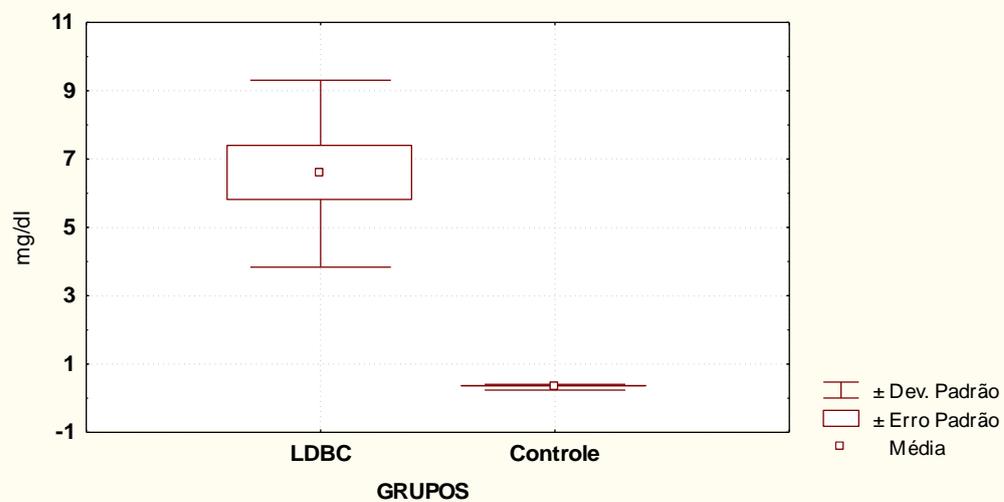


GRÁFICO 7 - Dosagens das Enzimas: Aspartato Aminotransferase (AST) Alanina Aminotransferase (ALT) e Fosfatase Alcalina (PAL) em Ratos Submetidos a LDBC + 99m Tc - E. Coli

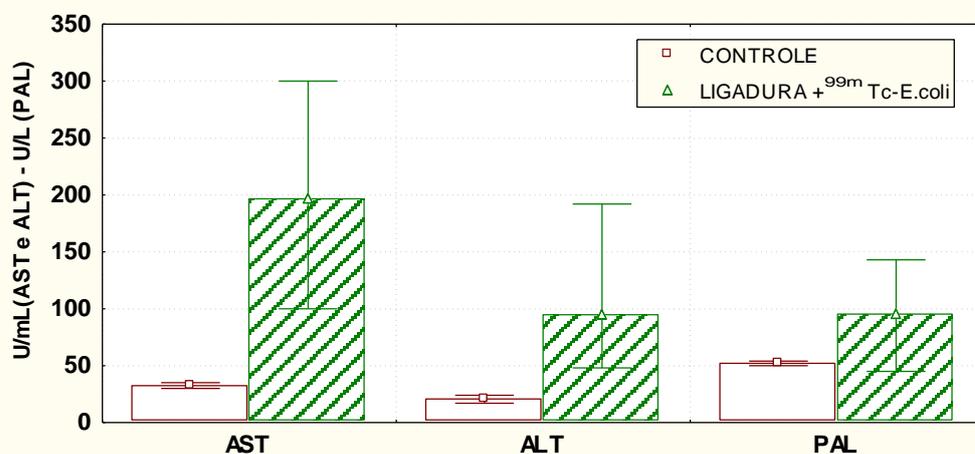


GRÁFICO 8 - Box Plot da Captação de ^{99m}Tc - E. Coli nos Órgãos segundo os Grupos

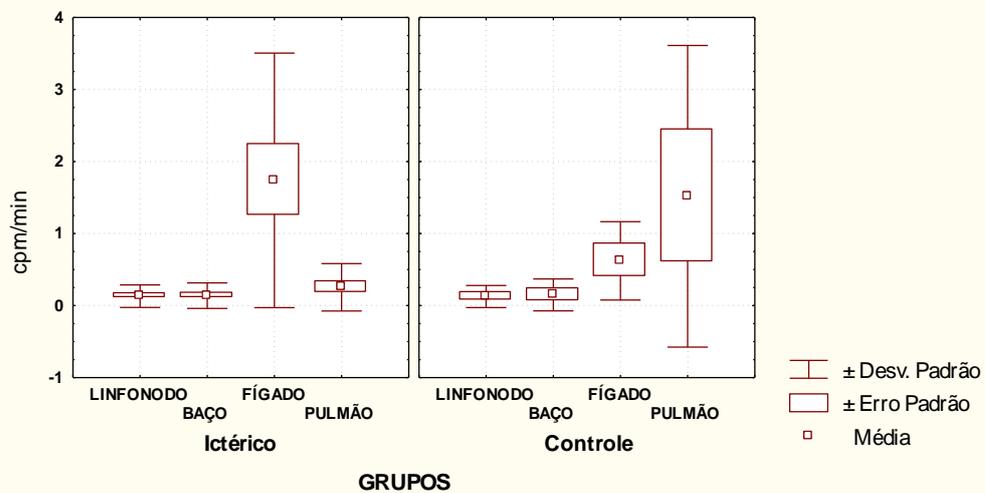
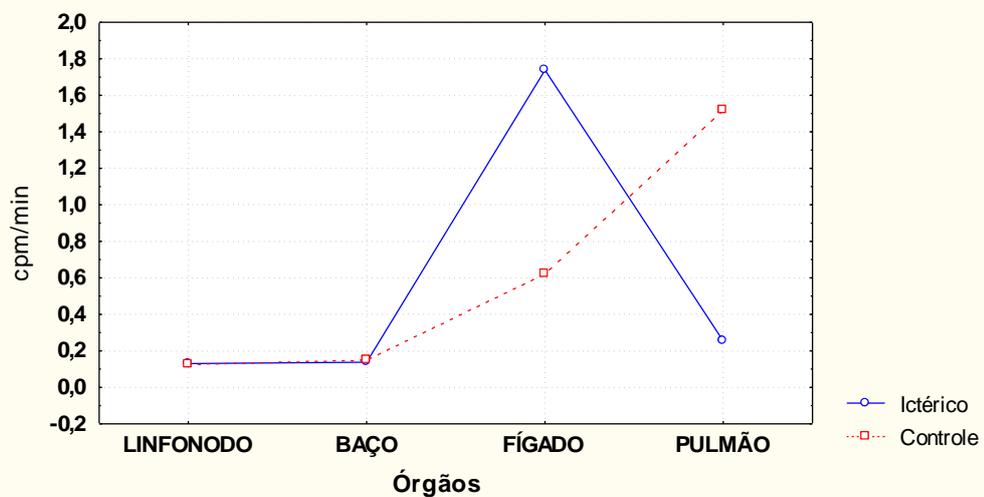


GRÁFICO 9 - Comparação de Médias da Variável Captação de ^{99m}Tc - E. Coli nos Órgãos segundo os Grupos



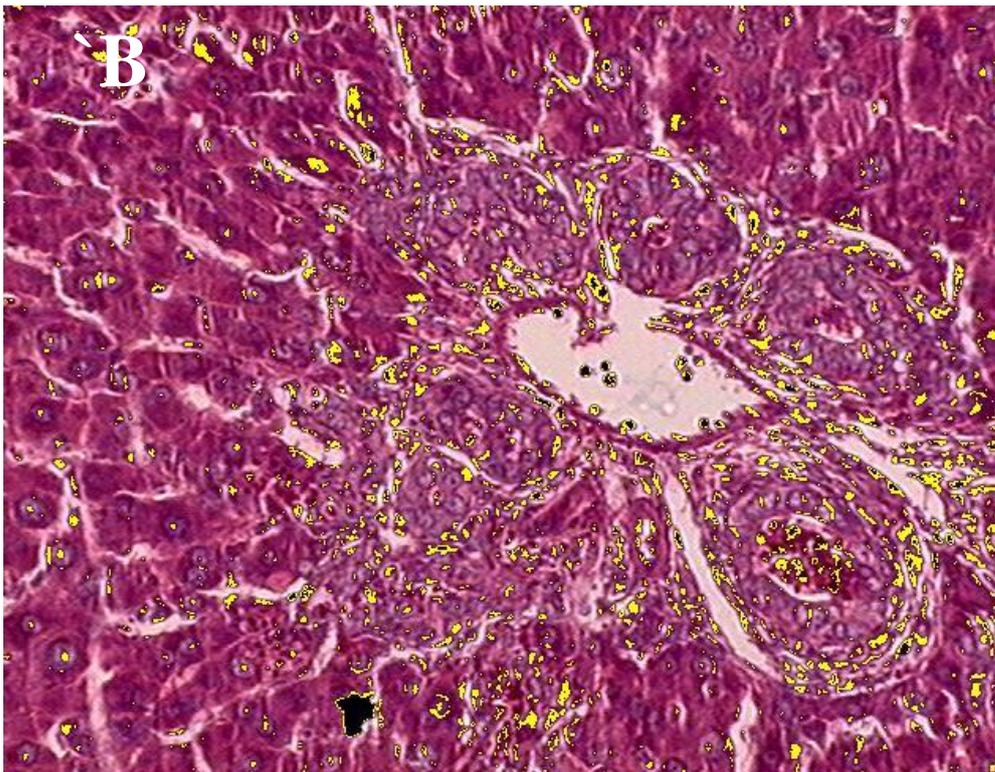
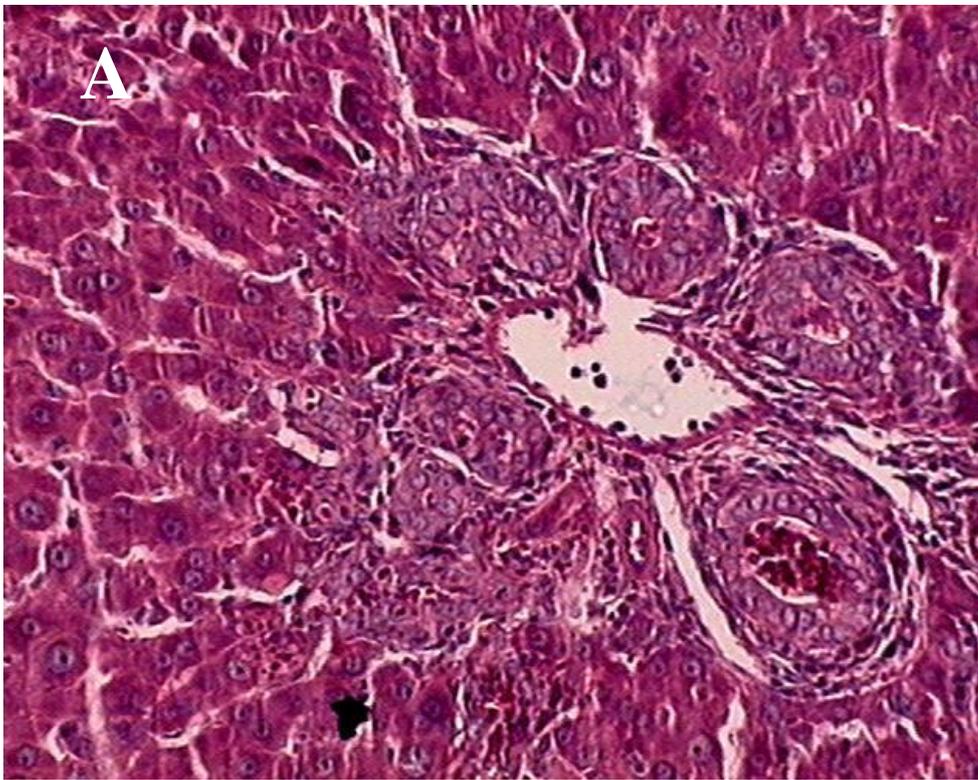


Figura 1: Corte de fígado mostrando infiltrado inflamatório portal. (ictérico) - Análise morfométrica. A – Antes da quantificação digital. B – Marcação em amarelo da quantificação. HE (x200)

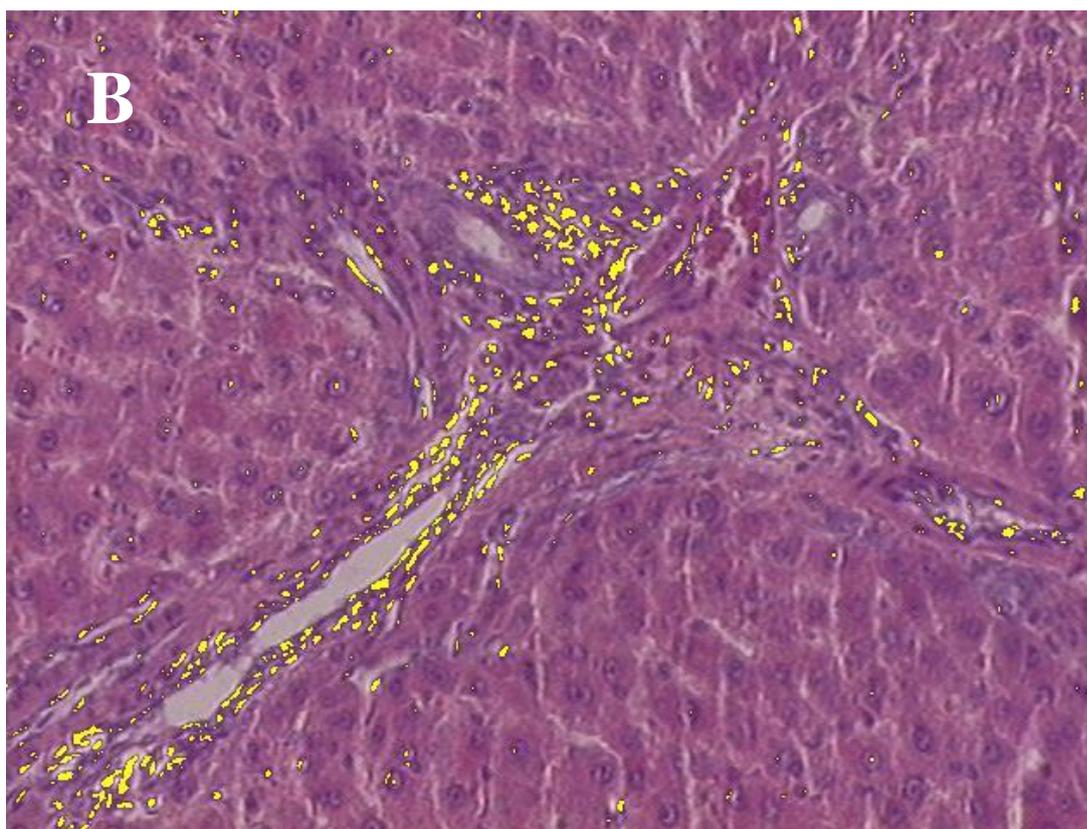
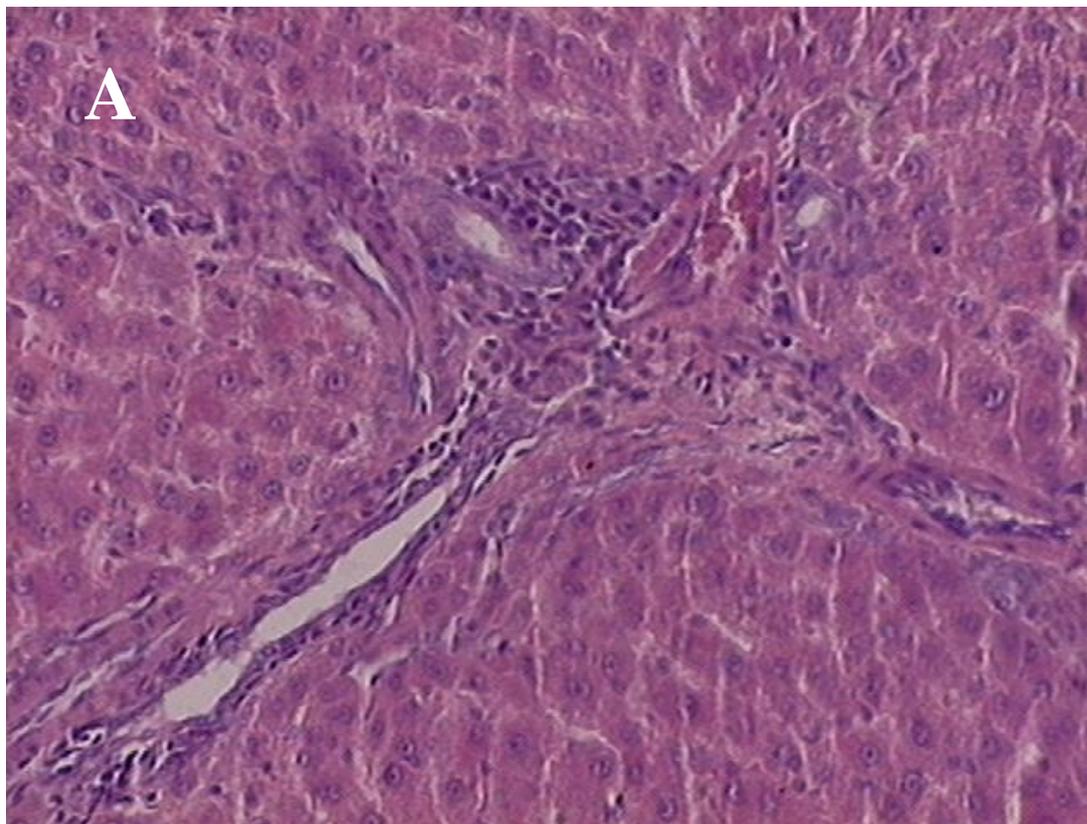


Figura 2: Corte de fígado mostrando infiltrado inflamatório periductal. (controle) - Análise morfométrica. A - Antes da quantificação digital. B - Marcação em amarelo da quantificação. HE (x200).

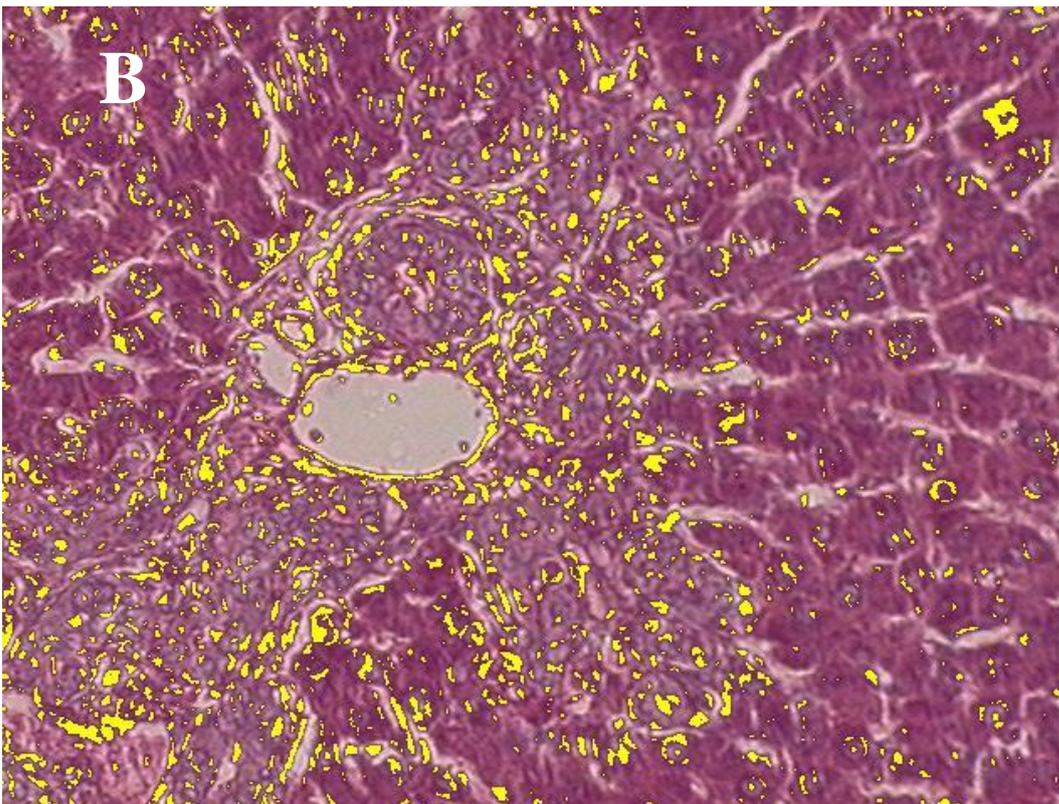
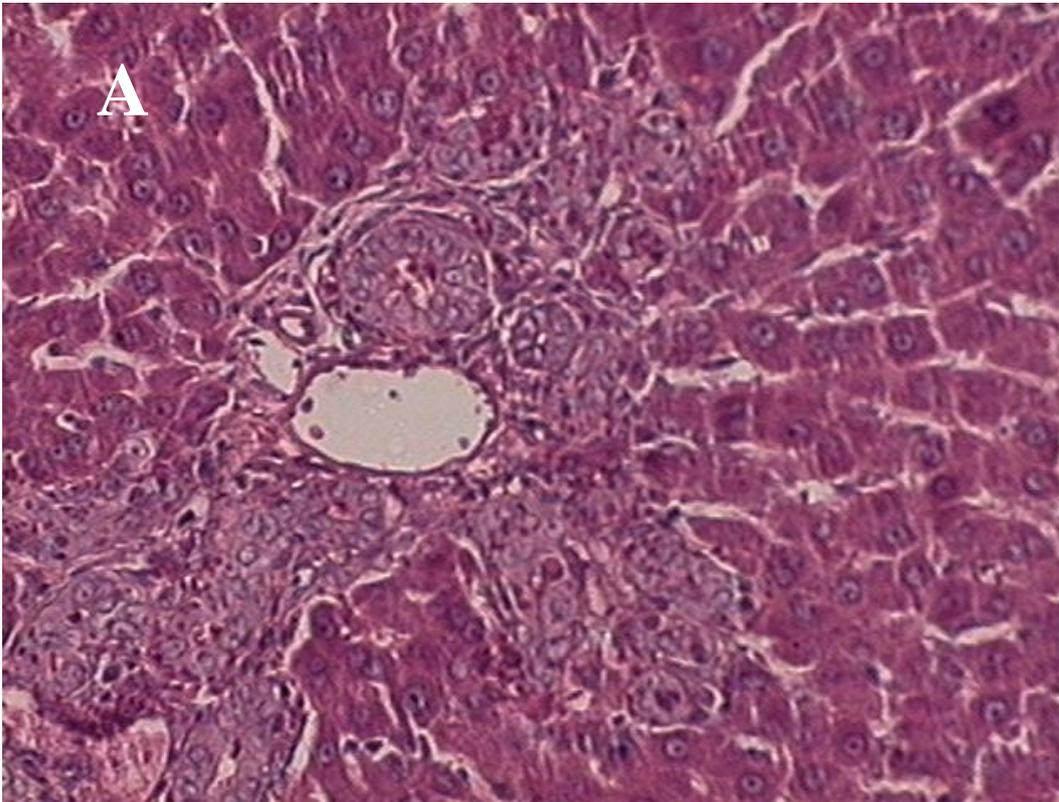


Figura 3: Corte de fígado mostrando infiltrado inflamatório periductal. (ictérico) - Análise morfométrica. A - Antes da quantificação digital. B - Marcação em amarelo da quantificação. HE (x200).

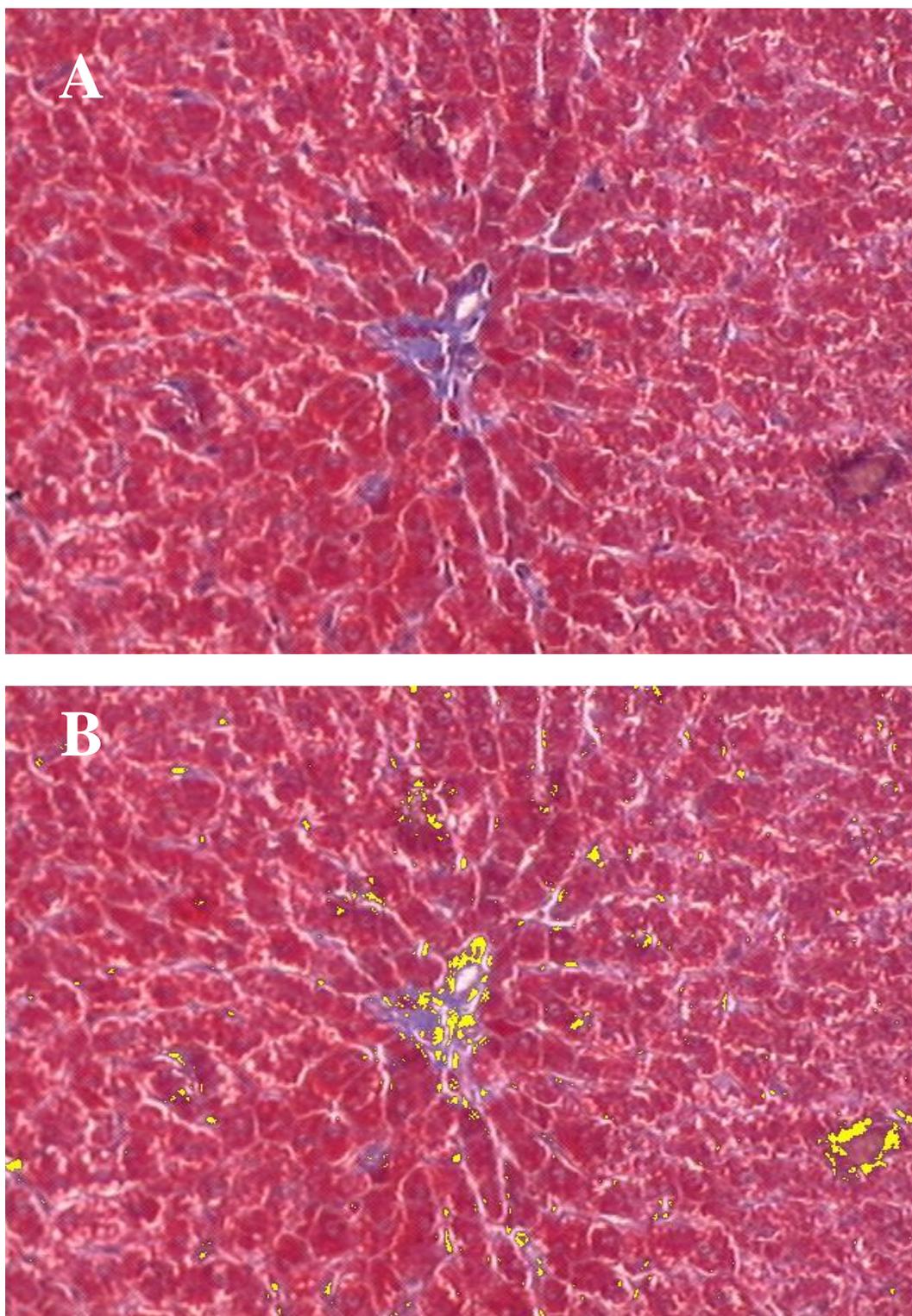


Figura 4: Corte de fígado mostrando infiltrado inflamatório intersticial. (controle) - Análise morfométrica. A – Antes da quantificação digital. B – Marcação em amarelo da quantificação. Tricrômico de Masson (x200).

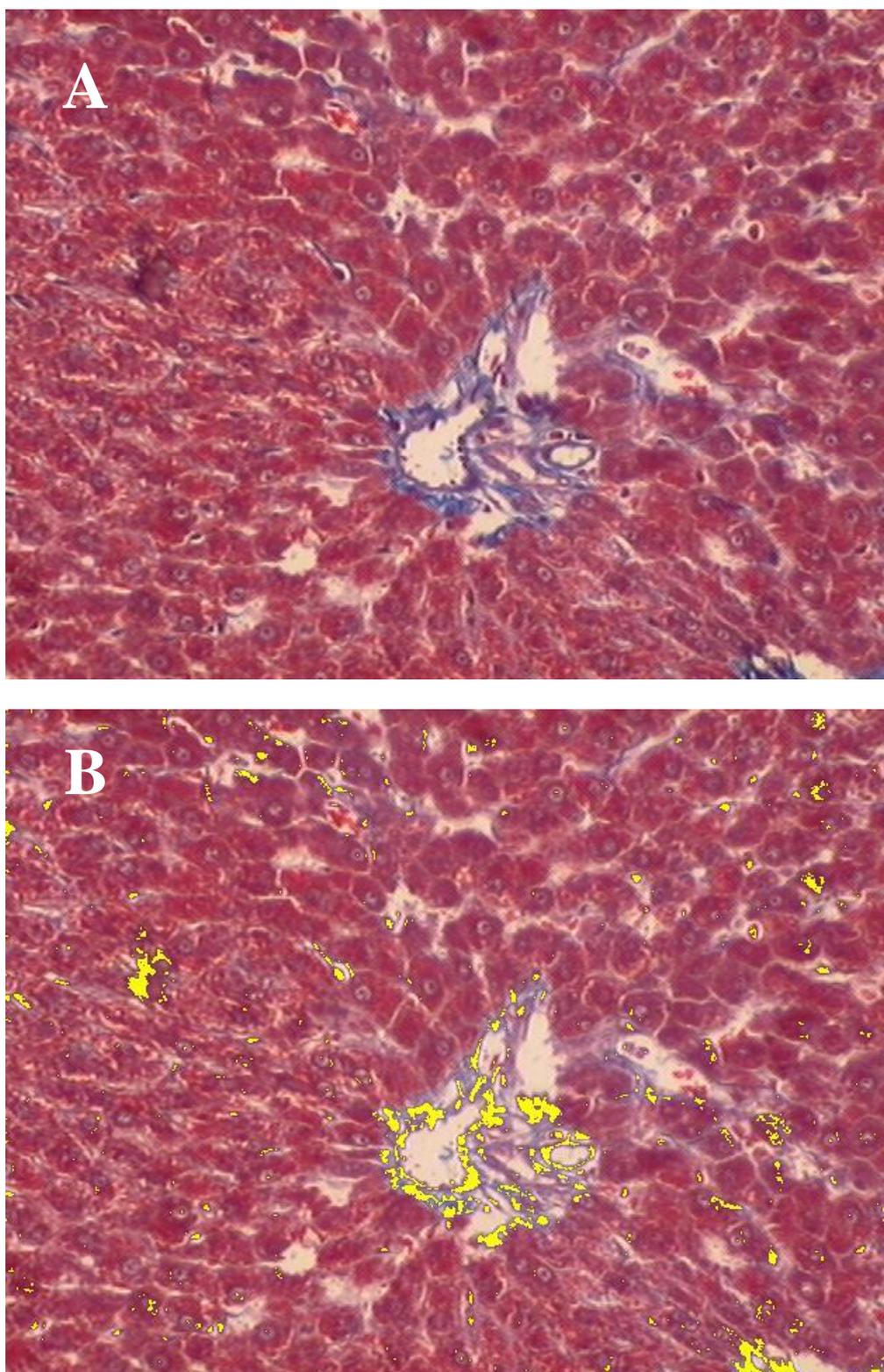


Figura 5: Corte de fígado mostrando infiltrado intersticial. (ictérico) - Análise morfométrica. A – Antes da quantificação digital. B – Marcação em amarelo da quantificação. Tricrômico de Masson (x200).

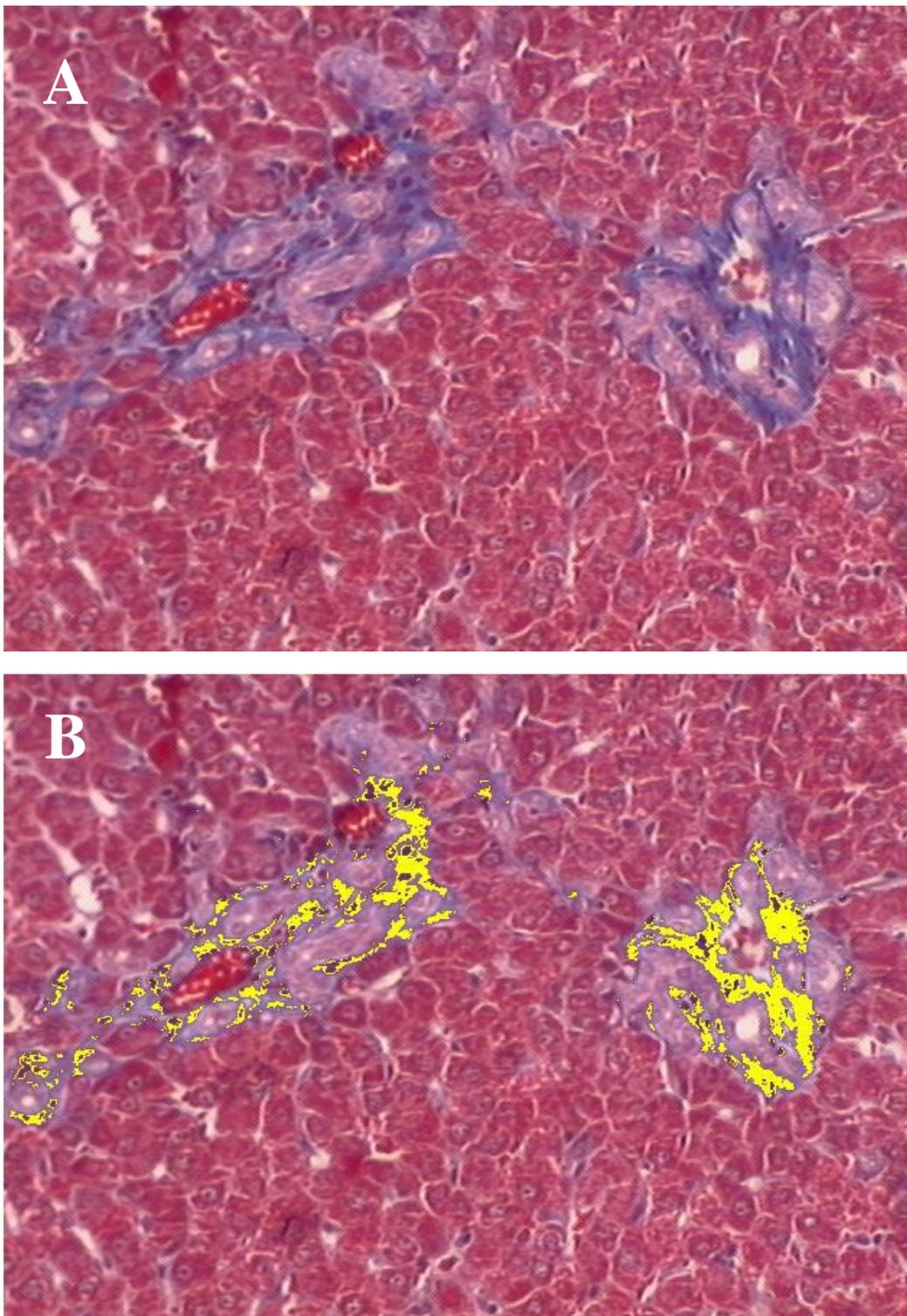


Figura 6: Corte de fígado mostrando proliferação ductal. (ictérico) - Análise morfométrica. A – Antes da quantificação digital. B – Marcação em amarelo da quantificação. Tricrômico de Masson (x200).

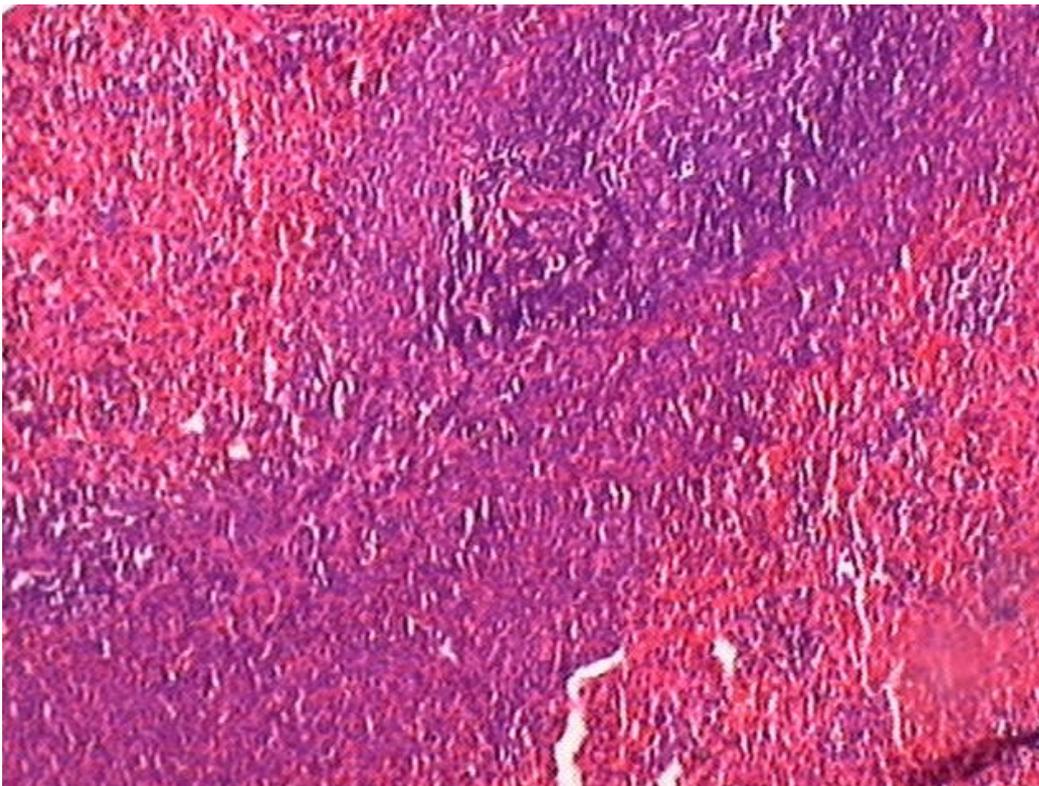


Figura 7: Corte de baço mostrando hiperplasia reativa de polpa branca. (ictérico).
HE (x200)

6 DISCUSSÃO

Está bem estabelecida na literatura que a translocação bacteriana (TB) está implicada na fisiopatologia das complicações associadas com a IO, como a sepse e a insuficiência renal.

Apesar dos avanços no que se refere a diagnóstico e terapêutica, a infecção e a endotoxemia continuam sendo as principais causas de morbidade e mortalidade em pacientes com IO.

A TB é definida como sendo a passagem de bactérias viáveis do trato gastrointestinal para sítios extraintestinais estéreis, tais como, nódulos linfáticos mesentéricos, baço, fígado, rins, cavidade peritoneal e corrente sanguínea¹.

Fatores que promovem esse processo incluem: disfunção da microflora intestinal, perda da imunidade do hospedeiro e injúria física da mucosa intestinal³.

O fenômeno da TB tem sido avaliado em vários modelos experimentais através de culturas bacterianas de órgãos, bactérias marcadas com radioisótopos, partículas não bacterianas marcadas com radioisótopos dentre outros^{1,3,6,8,11}.

A proposta do presente estudo foi analisar o fenômeno da TB para o fígado, baço, NLM e pulmões através de culturas bacterianas e através da análise cintilográfica da captação de *E. coli* marcada com ^{99m}Tecnécio (^{99m}Tc-*E. coli*) por esses órgãos em modelo experimental de IO experimental em ratos.

Os estudos sobre a TB na icterícia obstrutiva experimental em ratos utilizando culturas de bactérias encontram-se bem estabelecidos na literatura,

des de os clássicos trabalhos de Berg e Deitch demonstrando a ocorrência de translocação de bactérias intestinais para órgãos extra-intestinais^{1,3}.

Estudos empregando bactérias marcadas com isótopos radioativos foram realizados com a finalidade de demonstrar o fenômeno da TB em modelos experimentais de IO em ratos^{8,41,50}.

O experimento utilizando ^{99m}Tc-E.coli foi possível empregando cultura de E. coli (ATCC-10536) marcada com tecnécio conforme técnica descrita por Diniz⁵⁰. O estudo consistiu na administração da ^{99m}Tc-E.coli através de gavagem em ratos após sete dias de ligadura do ducto biliar e feita a contagem da radioatividade nos órgãos em cintilador gamma Ansr, Abbot.

Os resultados mostraram diferença estatisticamente significativa nas culturas de bactérias em órgãos nos ratos ictericos em relação aos do grupo controle ($p < 0,05$). Esses resultados estão de acordo com os trabalhos publicados na literatura^{1,3,8,23,24}. A translocação bacteriana na IO ocorre devido a diversos fatores como; ausência de bile no lúmen intestinal, alterações na mucosa intestinal e perda da imunidade do hospedeiro³. A ausência de bile no intestino resulta em endotoxemia⁵⁷. Cahill et al mostraram que a incidência de endotoxemia foi reduzida de 55% para zero com a administração oral de desoxicolato em IO em ratos²².

No presente estudo os níveis séricos de bilirrubina foram significativamente elevados nos ratos submetidos à LDBC em relação ao do controle. As alterações histopatológicas foram bem mais evidentes no grupo icterico, caracterizadas por infiltrado inflamatório portal a nível sinusoidal, proliferação ductal, alterações degenerativas de hepatócitos e alterações de células de Kupffer.

Segundo trabalhos de Clements *et al*⁴² após uma semana de ligadura do colédoco de ratos ocorre um aumento da endotoxemia para o fígado o que provoca uma estimulação das células de Kupffer, mas a longo prazo a obstrução causa depressão nessas células. Esses resultados foram posteriormente confirmados por Kimming *et al*, que mostraram depressão da função das células de Kupffer na IO em ratos⁴⁰ Bactérias marcadas com radioisótopos tem sido usada por alguns autores para avaliar o clearance de bactérias circulantes e função do SRE em ratos^{40,41,43}.

Os resultados do presente estudo não mostraram diferença estatisticamente significativa na captação da ^{99m}Tc-E.coli pelos órgãos entre os dois grupos: ictérico e controle. No entanto, na análise interativa ocorreu diferença significativa na captação da ^{99m}Tc-E.coli pelo fígado e pulmões entre os dois grupos, o fígado no grupo ictérico obteve uma maior captação em relação ao controle enquanto que nos pulmões dos animais controle ocorreu uma maior captação comparada ao grupo ictérico. Essa observação sugere que os resultados estão de acordo com as observações de Clements *et al*⁴² que demonstram uma estimulação das células de Kupffer na primeira semana de icterícia.

7 CONCLUSÃO

Os resultados concluíram que ocorreu translocação bacteriana para linfonodos, fígado, baço e pulmão verificado nas culturas bacterianas em ratos ictericos.

A captação da E. Coli marcada com ^{99m}Tc (^{99m}Tc - E. Coli) pelos órgãos não apresentou diferença estatisticamente significante entre os grupos ictericos e controle.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berg AD, Garlington, AW Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and the other organs in a gnotobiotic mouse model. *Infect Immun* 1979; 23: 403-11.
2. Edmiston CE. Bacterial translocation. *Surg Gynecol Obstet* 1991; 173: 73-83.
3. Deitch EA, Sitting K, Li M, Berg R, Specian RD. Obstructive jaundice promotes bacterial translocation from the gut. *Am J Surg* 1990; 159: 79-84.
4. Reynolds JV, Murchan P, Redmond HP, Watson RWG, Leonard N et al. Failure of macrophage activation in experimental obstructive jaundice: association with bacterial translocation. *Brit J Surg* 1995; 82: 534-538.
5. Deitch EA, Sitting K, Li M, Berg R, Specian RD. Endotoxin promotes the translocation of bacteria from the gut. *Arch Surg* 1987; 122: 185-190.
6. Alexander JW, Gianotti L, Pyles T, Carey MA, Babcock FG. Distribution and survival of *Escherichia coli* translocating from the intestine after thermal injury. *Ann Surg* 1991; 213: 558-567.
7. Redan JA, Rush BF, McCullough JN, Machiedo GW, Murphy TF, Dikdan GS, Smith S. Organ Distribution of radiolabeled enteric *Escherichia coli* during and after hemorrhagic shock. *Ann Surg* 1990; 211: 663-668.
8. Ding JW, Andersson R, Soltesz V, Willén R, Bengmark S. Obstructive jaundice impairs reticuloendothelial function and promotes bacterial translocation in the rat. *J Surg Res* 1994; 57: 238-245.
9. Schweinburg FB, Seligman AM, Fine J. Transmural migration of intestinal bacteria- A study based on the use of radioactive *Escherichia coli*. *Eng J Med* 1950; 242: 747-751.
10. Tanaka N, Ryden L, Bergqvist L, Christensen P, Bengmark S. Reticuloendothelial function in rats with obstructive jaundice. *Br J Surg* 1985; 72: 946-949
11. Petroianu A, Simal CJR, Barbosa AJA. Impairment of Phagocytosis by mammalian splenic macrophages by 99mTc sulphur colloid. *Med Sci Res* 1992; 20: 847-849.
12. Maejima K, Deitch E, Berg R. Promotion By burn stress of the translocation of bacteria from the gastrointestinal tract of mice. *Arch Surg* 1984; 119: 166-172.
13. Baker JK, Deitch EA. Haemorrhagic shock induces bacterial translocation from the gut. *J Trauma* 1988; 18: 898-906.

14. Deitch EA, Brodges RM. Effect of stress and trauma on bacterial translocation from the gut. *J Surg Res* 1987; 42: 536-542.
15. Deitch EA, Xu D, Naruhn MB *et al.* Elemental diet and IV-TNP induced bacterial translocation is associated with loss of intestinal mucosal barrier function against bacteria. *Ann Surg* 1995; 221: 299-307.
16. Medeiros AC, Ramos AMO, Silva MP, Dantas Filho AM, Dantas Jr JH, Freitas FCM Souza. Translocação bacteriana para o rim na icterícia obstrutiva experimental. *Act Cir Bras* 1997; 12(2): 121-4.
17. Von Gierke E. *Handbuch der Speziellen Pathologische Anatomie*, 7 ed, 1926; p.119.
18. Rosa H, Síndromes hepáticas. In Dani R, Castro LP. *Gastroenterologia clínica*. 3º ed. Rio de Janeiro: Guanabara- Koogan 1993; 2: 1138-1154.
19. Sherlock S, Dooley J. *Diseases of the liver and biliary system*. 10º ed. London: Blackwell Science 1997: 201-215.
20. Guyton AC. *Tratado de fisiologia médica*. 8º ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan 1992:864.
21. Keyghley MRB *et al.* Antibiotic treatment of biliary sepsis. *Surg Clin N Am* 1975; 55: 1379 – 1385.
22. Cahill CJ, Pain JA, Bailey ME. Bile salts, endotoxin and renal function in obstructive jaundice. *Surg Gynecol Obstet*. 1987; 165: 519-522.
23. Parks RW, Clements WD, Pope C, Halliday MI, Rowlands BJ, Diamond T. Bacterial translocation and gut microflora in obstructive jaundice. *J Anat* 1996; 189:561-565.
24. Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *J Med* 1992; 23: 217-244.
25. Fenella KS, Ramsden CW, MacLennan K *et al.* Increased intestinal permeability and altered mucosal immunity in cholestatic jaundice. *Ann Surg* 1998; 227:205-212.
26. Hentges DJ, Role of The intestinal microflora in host defenses against infection. In *Human Intestinal microflora in health and disease*. New York, Academic Press 1983; 311-332.
27. Reynolds JV, Murchan P, Leonard N, Clarke P, Keane FBV *et al.* Gut barrier failure in experimental obstructive jaundice. *J Surg Res* 1996; 62: 11-16.
28. Ding JW, Andersson R, Soltesz V, Parsson H, Johansson K *et al.* Inhibition of bacterial translocation in obstructive jaundice by muramyl tripeptide phosphatidylethanolamine in the rat. *J Hepatol* 1994; 20: 720-728.

29. Katayama M, Dazhong Xu, Specian RD, Deitch EA. Role of bacterial adherence and the mucus barrier on bacterial translocation. *Ann Surg* 1997; 225: 317-326.
30. Parks RW, Clements WD, Smye MG, Pope C, Rowlands BJ, Diamond T. Intestinal barrier dysfunction in clinical and experimental obstructive jaundice and its reversal by internal biliary drainage. *Brit J Surg* 1996; 83: 1345-1349.
31. Kocksar LT, Bartok L. Effects of bile acids on the intestinal absorption of endotoxins in rats. *J Bacteriol* 1969; 100: 220-223.
32. Armstrong CP, Dixon JM, Taylor TV et al. Surgical experience of deeply jaundiced patients with bile duct obstruction. *Br J Surg*. 1984; 71: 234-238.
33. Cakmakci M, Tirnaksiz B, Hayran M, Belek S, Gurbus T, Sayer I. Effects of obstructive Jaundice and external biliary diversion on bacterial translocation in rats. *Eur J Surg*. 1996; 162: 567-571.
34. Alverdy J, Aoye E. The effect of glucocorticoid administration on bacterial translocation. *Ann Surg*. 1991; 214: 719-723.
35. Wells CL, Jechorek RP, Erlandsen SL. Inhibitory effect of bile on bacterial invasion of enterocytes: Possible mechanism for increased translocation associated with obstructive jaundice. *Crit Care Med* 1995; 23: 301-307.
36. Conte VP. Fisiologia biliar. In Pinotti HW. *Tratado de Clínica Cirúrgica do Aparelho Digestivo*. Ed Atheneu. 1994; 2: 877-886.
37. Iwasaki M, Tanikawa K. Liver diseases and endotoxins. *Nippon Shokakibyo Gakki Zasshi* 1981; 78: 1232-1240.
38. Shen-Chen SM, Phuonglan C, Harris HW. Obstructive jaundice alters Kupffer cell function independent of bacterial translocation. *J Surg Res* 1998; 80: 205-209.
39. Karsten TM, Gulik TM, Spanjaard L, Bosma A et al. Bacterial translocation from the biliary tract to blood and lymph in rats with obstructive jaundice. *J Surg Res*. 1998; 74: 125-130.
40. Kimmings AN, Deventer SJH, Obertop H, Rauws EAJ, Gouma DJ. Inflammatory and immunologic effects of obstructive jaundice: pathogenesis and treatment. *J Am Coll Surg* 1995; 181: 567-581.
41. Kats S, Grosf LD, Cross K. Impaired bacterial clearance and trapping in obstructive jaundice. *Ann Surg* 1984; 199: 14-20.
42. Clements WDB, Halliday MI, McCaigue MD and others. Effects of extrahepatic obstructive jaundice on Kupffer cell clearance capacity. *Arch Surg* 1993; 128: 200-205.

43. Megison SM, Dunn CW, Horton JW, Chao H. Effects of relief of biliary obstruction on mononuclear phagocyte system function and cell mediated immunity. *Br J Surg* 1991; 78: 568-571.
44. Pain JÁ. Reticulo-endothelial function in obstructive jaundice. *Br J Surg* 1987; 74: 1091-1094.
45. Steffen EK, Berg ED, Deitch, ED. Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node. *J Infect Dis.* 1988; 157: 1032-1038.
46. Ravin HA, Fine J. Biological implications of intestinal endotoxin. *Fed Proc* 1962; 21: 65.
47. Alverdy JC, Aoye E, Moss GS. Total parenteral nutrition promotes bacterial translocation from the gut. *Surg* 1985; 104: 186.
48. Berg RD. Bacterial translocation from gastrointestinal tract of mice immune suppressive chemotherapeutic agents. *Curr Microbiol* 1983; 8:285.
49. Jones AG. Technetium in nuclear medicine. *Radioch Act* 1995; 70/71: 289-297.
50. Diniz SOF, Resende BM, Nunan EA, Simal CJR, Cardoso VN. ^{99m}Technetium labelled *Escherichia coli* Applied Radiation Isotopes 1999; 51: 33-36.
51. Arden WA, Yacko MA, Jay M, Beihn RM, Derbin M, Gross DR, Schwartz RW. Scintigraphic evaluation of bacterial translocation during hemorrhagic shock. *J Surg Res* 1993; 54: 102-106.
52. Plotkowski MC, Beck G, Bernardo Filho M, Oliveira EF, Hinnrasky J, Puchelle E. Evaluation of the ^{99m}-technetium labeling effect on *Pseudomonas aeruginosa* surface properties. *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1987; 138: 415-426.
53. Bernardo Filho M, Pereira JA, Boasquevisque EM, Hasson-Voloch A. Technetium-99m distribution into *Klebsiella pneumoniae*. *J Nucl Biol Méd* 1991; 35: 162-166.
54. StatSoft, Inc.. STATISTICA for Windows [Computer program manual]. Tulsa, OK: StatSoft, 1995
55. Siegel, S. Estatística Não-paramétrica. São Paulo: McGraw Hill do Brasil, 1975.
56. Montgomery, D.C., *Design and Analysis of Experiments*. Wiley, 4ª edição, New York 1997.
57. Slocum M M, Sittig K M, Specian R D, Deitch E A. Absence of intestinal bile promotes bacterial translocation. *Am Surg* 1992; 58: 305-310.

ANEXOS

GRUPOS	ÓRGÃO LINFONÓDO			
Grupo Ictérico e o Grupo Controle	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	P-valor
Efeito	1	0,000066	0,000072	0,993272

GRUPOS	ÓRGÃO BAÇO			
Grupo Ictérico e o Grupo Controle	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	P-valor
Efeito	1	0,000385	0,000419	0,983734

GRUPOS	ÓRGÃO FÍGADO			
Grupo Ictérico e o Grupo Controle	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	P-valor
Efeito	1	4,403833	4,789318	0,032541

GRUPOS	ÓRGÃO PULMÃO			
Grupo Ictérico e o Grupo Controle	Grau de liberdade	Quadrado médio	F	P-valor
Efeito	1	5,636469	6,129851	0,016131