



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

RICARDO SILVA PARREIRA

**COMPARAÇÃO DAS ADERÊNCIAS PERITONEAIS APÓS
LAPAROSCOPIA E LAPAROTOMIA CONVENCIONAL EM
MODELO EXPERIMENTAL DE PERITONITE EM RATOS**

RICARDO SILVA PARREIRA

**COMPARAÇÃO DAS ADERÊNCIAS PERITONEAIS APÓS
LAPAROSCOPIA E LAPAROTOMIA CONVENCIONAL EM
MODELO EXPERIMENTAL DE PERITONITE EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio de Freitas Rodrigues

Londrina
2013

Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P259c	Parreira,Ricardo Silva. Comparação das aderências peritoneais após laparoscopia e laparotomia convencional em modelo experimental de peritonite em ratos / Ricardo Silva Parreira. – Londrina, 2013. 59 f.: Il. Orientador: Marco Aurélio de Freitas Rodrigues. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós- Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, 2013. 1. Peritonite x Modelos animais – Teses. 2. Peritônio x Aderências – Teses. 3. Cirurgia x Complicações e seqüelas – Teses. 4. Cirurgia laparoscópica – Teses. 5. Rato como animal de laboratório – Teses. I. Rodrigues, Marco Aurélio de Freitas. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título. CDU 616.33-092
-------	--

RICARDO SILVA PARREIRA

**COMPARAÇÃO DAS ADERÊNCIAS PERITONEAIS APÓS
LAPAROSCOPIA E LAPAROTOMIA CONVENCIONAL EM MODELO
EXPERIMENTAL DE PERITONITE EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marco Aurélio de Freitas Rodrigues
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Ides Miriko Sakassegawa
Sperandio
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Lucio Tedesco Marchese
UEL – Londrina - PR

Profa. Dra. Suzana de Fátima Paccola
Mesquita
UEL – Londrina - PR

Prof. Dr. Silvio Henrique Maia de Almeida
UEL – Londrina - PR

Londrina, 25 de janeiro de 2013.

“Toda boa dádiva e todo dom perfeito vêm do alto, descendo do Pai das luzes, que não muda como sombras inconstantes”. Tiago 1:17

A Deus por me capacitar à realização desta tese e por me acompanhar em todos os momentos da minha formação.

À minha querida esposa Isabel Cristina, pelo amor, incentivo e compreensão na minha ausência.

Aos meus filhos Eduarda e Davi Miguel pela alegria nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais Ary e Joana D'arc Parreira pelos ensinamentos e incentivos.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio de Freitas Rodrigues que me orientou e transmitiu sua experiência na viabilização deste trabalho.

Aos professores da Disciplina de Cirurgia Pediátrica da UEL: Lucio T. Marchese, Fernando Costa, Sylvio Villari Filho, Eurico S. Komatsu, Ides Miriko S. Sperandio e Mauro Roberto Basso. Pelos ensinamentos na medicina e cirurgia pediátrica e pela colaboração e incentivo na realização deste trabalho, o meu sincero reconhecimento.

À Marsileni Pelisson e ao José Wander Bregano, pela grande paciência ao atender meus intermináveis pedidos, pela ajuda no laboratório e pela gentileza.

À Ângela N Gordan pela dedicação na realização da imunohistoquímica.

À Prof. Dr^a. Suzana de Fátima P. Mesquita, pelo carinho e dedicação na orientação do uso do Image J.

Ao Prof. Dr. Décio S. Barbosa, pela dedicação com que desempenha a coordenação do programa de pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde da UEL e pela compreensão na prorrogação do prazo de entrega da dissertação da tese deste estudo.

A todos os demais professores, sem exceções, por dividirem comigo seus preciosos conhecimentos.

A todos os amigos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho, principalmente aos colegas de trabalho.

Ao Donizete Rodrigues Belitardo e Izaltino Farias, pela presteza no auxílio durante todos os experimentos e no fornecimento dos animais utilizados.

PARREIRA, Ricardo Silva. **Comparação das aderências peritoneais após laparoscopia e laparotomia convencional em modelo experimental de peritonite em ratos**. 2013. 59 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a quantidade e a qualidade das aderências peritoneais após laparoscopia e laparotomia convencional na vigência de peritonite bacteriana, em um modelo de experimental já descrito. **Método:** Foram utilizados 40 ratos machos, da linhagem Wistar, divididos aleatoriamente em 4 grupos experimentais (n=10/grupo): CoLC (Controle Laparotomia Convencional), CoL5 (Controle Laparoscopia a 5 mmHg), PeLC (Peritonite Laparotomia Convencional) e PeL5 (Peritonite Laparoscopia a 5 mmHg). A peritonite bacteriana foi estimulada pela inoculação de *Escherichia coli* ATCC 25922 na concentração de 10^4 UFC/ml, por punção transparietal. Após 24 horas, os animais foram submetidos às cirurgias de implante de película de silicone lateral à artéria epigástrica direita, tanto por técnica aberta como laparoscópica. No 14° dia pós cirúrgico, os ratos foram submetidos à laparotomia exploradora e avaliação macro e microscópica das aderências. A avaliação qualitativa foi realizada, através do escore de Diamond modificado, em que a pontuação é realizada de acordo com a tenacidade, tipo e extensão. A tenacidade é a resistência encontrada ao tentar soltar a aderência da película: ausente (0), solta parcialmente (1), solta com tração (2) ou com dissecção fina (3). O tipo da adesão é avaliado pelo aspecto da aderência sobre a película: ausente (0), fina (1), densa sem vaso (2), densa com vasos pequenos (<50 μ m) (3) e densa com vasos grandes (50-100 μ m) (4). A extensão é avaliada pela porcentagem da área da película coberta pela aderência epíplon peritoneal: sem aderência (0), menor que 25% (1), entre 25 e 50% (2), entre 50 e 75% (3) e maior que 75% (4). A avaliação quantitativa foi realizada através da microdensidade vascular (MDV), de imagens endoteliais marcadas por anticorpos anti CD-34, pela técnica de imunohistoquímica. **Resultados:** A contagem de leucócitos do grupo com peritonite (23,53 cel/mm³) foi superior ao grupo controle (16,29 cel/mm³)(p=0,048). A presença de epíplon aderido na película não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os 4 grupos (p=0,395). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os escores de aderência dos 4 grupos (p=0,849; p=0,379). A MDV dos grupos CoLC(3,66%±0,73), CoL5(3,56%±0,49), PeLC(3,40%±0,59) e PeL5(3,53%±0,40) não apresentou diferença estatisticamente significativa (p=0,775). **Conclusão:** Conclui-se que pelos critérios de avaliação utilizados, a quantidade e qualidade das aderências peritoneais foram iguais tanto na laparotomia convencional quanto na laparoscopia, independentemente de existir peritonite.

Palavras chave: Adesão. Peritônio. Laparoscopia. Pneumoperitônio. Peritonite. Ratos.

PARREIRA, Ricardo Silva. **Comparison of peritoneal adhesions after conventional laparoscopy and laparotomy in experimental peritonitis in mice.** 2013. 59 f. Dissertation (Master of Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2013.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the quantity and quality of peritoneal adhesions after conventional laparoscopy and laparotomy in the presence of bacterial peritonitis, in a model of adherence already described. **Methods:** A total of 40 male rats, Wistar, randomly divided into 4 groups (n = 10/group): CoLC (Control Laparotomy Conventional), CoL5 (Control Laparoscopy 5 mmHg), PeLC (Peritonitis Laparotomy Conventional) and PeL5 (Peritonitis Laparoscopy 5 mmHg). The bacterial peritonitis was stimulated by inoculation of *Escherichia coli* ATCC 25922 at a concentration of 10⁴ CFU/ml, puncture transparietal. After 24 hours, the animals underwent surgery to implantation of silicone film side epigastric artery to the right, both open and laparoscopic technique. At 14 ° day after surgery, the rats underwent laparotomy and macroscopic and microscopic evaluation of adhesions. A qualitative assessment was performed using the modified Diamond score, where the score is performed according to the toughness, type and extension. The toughness is evaluated by the resistance when trying to loosen the grip of the film: absent (0), partially loose (1), with loose traction (2) or with fine dissection (3). The type of adhesion is evaluated by the appearance on the film adhesion: absent (0), thin (1), without dense vessel (2) is dense with small vessels (<50µm) (3) and dense with large vessels (50 - 100µm) (4). The extension is measured by the percentage of the area covered by the film adhesion peritoneal omentum: no adhesion (0), less than 25% (1) between 25 and 50% (2) between 50 and 75% (3) and greater than 75% (4). The quantitative evaluation was performed using the micro vascular density (MVD), endothelial labeled photos by anti-CD 34, by immunohistochemistry.

Results: WBC group with peritonitis (23.53 cells/mm³) was superior to the control group (16.29 cells/mm³) (p = 0.048). The presence of omentum adhered to the film showed no statistically significant difference among the 4 groups (p = 0.395). There was no statistically significant difference between the adhesion scores of the 4 groups (p = 0.849, p = 0.379). The MVD of CoLC groups (3.66% ± 0.73), CoL5 (3.56% ± 0.49), PeLC (3.40% ± 0.59) and PeL5 (3.53 ± 0.40%) showed no statistically significant difference (p = 0.775). **Conclusion:** It is concluded that the evaluation criteria used, the quantity and quality of peritoneal adhesions were equal in both conventional laparotomy and laparoscopy laparotomy, regardless of whether peritonitis.

Keywords: Adhesion. Peritoneum. Laparoscopy. Pneumoperitoneum. Peritonitis. Mice.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
BSA	Bovine Serum Albumin
CCB	Centro de Ciências Biológicas
CEUA	Comitê de Ética em Uso Animal
Cm	Centímetro
Co L5	Controle Laparoscopia a 5mmHg
Co LC	Controle Laparotomia Convencional
CO₂	Dióxido carbônico
DAB	3,3 – Diaminobenzidina tetra-hidroclorido
EDTA	Ethylene-Diamine-Tetra-Acetic-Acid
G	Grama
HUL	Hospital Universitário de Londrina
Kg	Quilograma
Min	minutos
MDV	Micro Densidade Vascular
MG	Miligrama
MI	Mililitros
mmHg	Milímetros de mercúrio
O₂	Gás oxigênio
PAI	Plasminogen Activator Inhibitor
PAI-1	Plasminogen Activator Inhibitor type 1
PAI-2	Plasminogen Activator Inhibitor type 2
PDF	Produtos da Degradação da Fibrina
PBS	Phosphate Buffered Saline
PeL5	Peritonite Laparoscopia a 5mmHg
PeLC	Peritonite Laparotomia convencional
PMN	Polimorfonucleares
POI	Pós Operatório Imediato
SF	Solução Fisiológica
tPA	Tissue-Type Plasminogen Activator
UEL	Universidade Estadual de Londrina
UEM	Universidade Estadual de Maringá

UFC	Unidade Formadora de Colônias
Mm	Micrômetro

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Resultados das médias, desvios padrões e ANOVA das variáveis quantitativas: Inóculo(mL), Tempo de inoculação(min), Peso corpóreo do animais na cirurgia(g) e Tempo de cirurgia(min).....38
- Tabela 2** – Resultados das avaliações do escore de aderência pelos avaliadores 1 e 2 dos grupos CoLc, CoL5, PeLc, PeL539
- Tabela 3** – Resultados das MDV(%) dos grupos CoLc, CoL5, PeLc, PeL540

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Organograma representativo da distribuição dos ratos nos grupos CoLC, CoL5, PeL5 e PeL5	20
Figura 2 – Cronograma dos procedimentos cirúrgicos	20
Figura 3 – Indução da peritonite – Punção transparietal abdominal seguida de injeção inóculo de <i>E.coli</i> (Grupo Pe) ou SF0,9% (Grupo Co)	22
Figura 4 – Pneumoperitônio instalado a pressão de 5 mmHg – Cistoscópio pediátrico e trocar 5mm posicionados	23
Figura 5 – Introdução da película de silicone na cavidade com porta agulha laparoscópico	23
Figura 6 – Punção transparietal em quadrante inferior esquerdo com agulha de Cater-Thomas modificada	24
Figura 7 – Fixação da película de silicone na parede abdominal	24
Figura 8 – Implante da película de silicone por laparotomia convencional.....	25
Figura 9 – Película acomodada na face peritoneal da parede abdominal.....	25
Figura 10 – Laparotomia exploradora – Incisão subcostal bilateral (linha preta).....	26
Figura 11 – Avaliação macroscópica das aderências no sítio cirúrgico e incisão cirúrgica (setas).....	26
Figura 12 – Avaliação da extensão ocupada pela aderência sobre a película.....	27
Figura 13 – Medição do maior diâmetro do vaso de maior comprimento.....	27
Figura 14 – Imagem a microscopia óptica com aumento 40X da interface película peritônio (seta). Imunohistoquímica com anticorpo antiCD34	27
Figura 15 – Imagens de endotélio marcado com anticorpo anti CD-34 (setas) em aumento de 100X	29
Figura 16 – Imagem convertida para 8 bits, representada em tons de cinza	30
Figura 17 – Imagem com área endotelial limitada (vermelho).....	30
Figura 18 – Imagem utilizada para o cálculo da porcentagem de área dos vasos em relação ao fundo (MVD).....	30

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 ADERÊNCIA.....	14
1.1.1 Peritônio	14
1.1.2 Evolução Clínica das Aderências	15
1.2 LAPAROSCOPIA.....	16
1.3 PERITONITE	16
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3 MATERIAIS E MÉTODO	19
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	19
3.2 AMOSTRA	19
3.3 PROCEDIMENTOS	20
3.3.1 Obtenção da Bactéria.....	21
3.3.2 Anestesia e Inoculação	21
3.3.3 Implante da Película de Silicone.....	22
3.3.4 Laparotomia Exploradora e Avaliação Macroscópica.....	25
3.4 AVALIAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA	27
3.4.1 Imagem e Avaliação de Microdensidade Vascular	27
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	30
4 RESULTADOS	32
5 DISCUSSÃO	41
REFERÊNCIAS	45
ANEXOS	51
ANEXO A – Aprovação do CEUA.....	52
ANEXO B – Escore Total de Adesão (Diamond modificado)	53

ANEXO C – Gráfico 1 – Valores dos inóculos (ml) dos grupos CoLC, CoL5, PeLC e PeL5	54
ANEXO D – Gráfico 2 – Valores dos pesos cirurgia (g) dos grupos CoLC, CoL5, PeLC e PeL5	55
ANEXO E – Gráfico 3 – Valores dos tempos de inoculação (min) dos grupos CoLC, CoL5, PeLC e PeL5.....	56
ANEXO F – Gráfico 4 – Valores dos tempos de cirurgia (min) dos grupos CoLC, CoL5, PeLC e PeL5.....	57
ANEXO G – Gráfico 5 – Valores dos escores de aderência dos grupos CoLC, CoL5, PeLC e PeL5.....	58
ANEXO H – Gráfico 6 – Valores MDV(%) dos grupos CoLC, CoL5, PeLC e PeL5	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 ADERÊNCIA PERITONEAL

A aderência peritoneal tem sido motivo de pesquisa, *in vitro* e *in vivo*, há mais de 120 anos, desde os estudos de Von Dembrowski em 1889¹. Entretanto a literatura não apresenta uma definição oficial e nem classificação padronizada para avaliação objetiva da extensão e severidade das adesões. Ela pode ser definida como junção estável entre duas ou mais estruturas peritoneais, que normalmente encontram-se separadas, decorrente de alguma situação anormal na cavidade peritoneal.

1.1.1 Peritônio

O peritônio é a maior membrana serosa do corpo, reveste totalmente a cavidade abdominal, pélvica (peritônio parietal) e seus órgãos (peritônio visceral), exceto os ovários e tem como função proteger os órgãos destas cavidades. É composto de três camadas: mesotélio, camada única de células, mais superficial; lâmina basal, intermediária e sub mesotélio, mais profunda e composta por matriz extracelular, rica em colágeno, fibroblastos, macrófagos, mastócitos, adipócitos, capilares sanguíneos e linfáticos². A homeostase da cavidade peritoneal é mantida pela difusão e reabsorção de líquidos e moléculas através do mesotélio e espaço submesotelial, o que permite a presença de líquido peritoneal, importante no funcionamento dos órgãos da cavidade abdominal e pélvica. A lesão do peritônio por causas cirúrgicas, infecciosas ou isquêmicas, promove o desnudamento da superfície peritoneal local com liberação de mediadores inflamatórios pelas células endoteliais e mesoteliais lesadas, o aumento da permeabilidade capilar dos vasos locais e extravazamento de células inflamatórias do tipo polimorfonucleares (PMN). A exposição da membrana basal ao sangue e a liberação de extratos teciduais estimulam a ativação da cascata de coagulação local e resulta na produção de fibrina, que é depositada no leito da lesão juntamente com o líquido exsudativo inflamatório; formando uma matriz fibrinosa, com objetivo de controlar o sangramento local. Raftery (1973) demonstrou a importância dos PMN leucócitos nas primeiras 48 horas, através de exame por microscopia eletrônica em ratos.

Paralelamente, há ativação do sistema fibrinolítico que tem como elemento principal o ativador de plasminogênio tecidual (tPA) produzido pelas células endoteliais, células mesoteliais e macrófagos, que transforma o plasminogênio em plasmina. A plasmina degrada a fibrina em produtos da degradação da fibrina (PDF) e desfaz as aderências. A atividade do tPA é amenizada por 2 inibidores da atividade do plasminogênio (PAI): tipo 1 (PAI-1) e tipo 2 (PAI-2), sendo o primeiro mais ativo³.

As aderências peritoneais são responsáveis pelo suprimento sanguíneo das áreas isquêmicas do intestino após cirurgia, mas com o passar do tempo, ocorre involução dos vasos e permanece tecido fibrótico^{4,5}. Alguns autores demonstraram, em modelos experimentais com ratos, a presença de vasos na aderência a partir da sexta hora após a lesão peritoneal, com pico da angiogênese entre o oitavo e décimo segundo dia^{6,7}.

1.1.2 Evolução Clínica das Aderências Peritoneais

As aderências peritoneais são classificadas em congênitas, geralmente assintomática, ou adquiridas pós-processo inflamatório ou cirurgia⁸. As aderências estão presentes em 10% dos casos de pacientes sem cirurgia prévia e em 90% no grupo de pacientes pós-cirúrgico⁴. Dor abdominal, obstrução intestinal e infertilidade feminina são as complicações mais comuns das aderências⁹⁻¹¹. São responsáveis por 70% das causas de readmissão hospitalar por obstrução do intestino delgado, representa ônus para os sistemas de saúde: o custo com internações e cirurgias para lise de aderências foi de US\$ 1,3 bilhões, em 1994, nos EUA e com reinternações hospitalares por queixas relacionadas à aderência peritoneal na Finlândia foi de £ 2 milhões, no ano de 1999¹¹⁻¹³. A aderência peritoneal é responsável por 65-75% das obstruções do intestino delgado e destas, 16% necessitam de fibrinólise cirúrgica, com mortalidade entre 15 a 20%^{14,15}. É a maior responsável pela infertilidade feminina secundária, representa mais de 20% dos casos, e 40% das causas de dor abdominal baixa em pacientes submetidos à cirurgia^{9-11,16-18}.

1.2 LAPAROSCOPIA

O acesso laparoscópico no tratamento das afecções abdominais tem sido amplamente utilizado nas cirurgias gastrointestinais, ginecológicas, urológicas e de urgência. As indicações de cirurgia laparoscópica cresceram e, hoje, incluem doenças associadas à peritonite, como colecistites, apendicites e diverticulites, entre outras.

Embora a laparoscopia apresente vantagens em relação à laparotomia, estudos mostram que esta técnica cirúrgica não é isenta de danos ao peritônio, pois provoca hipóxia e dissecação peritoneal na vigência de elevada pressão intra abdominal¹⁹. A instalação do pneumoperitônio desencadeia retrações das células mesoteliais, formam-se fendas entre células que expõe a lâmina basal, ativa os sistemas inflamatório e fibrinolítico; e a cascata da coagulação. Células inflamatórias têm sido encontradas no peritônio de ratos a partir de 2 horas após o início do pneumoperitônio, enquanto após 24 horas, observa-se a presença de infiltrado inflamatório crônico e ilhotas de células mesoteliais²⁰. O gás mais utilizado para realização do pneumoperitônio é o dióxido de carbono (CO₂), devido à sua segurança, alta solubilidade na água e pelo fato de ser exalado pelos pulmões; mas já se sabe que este gás afeta a morfologia e a homeostase peritoneal. Longos períodos de pneumoperitônio com CO₂ e alta pressão de insuflação diminuem o fluxo capilar peritoneal, elevam a hipóxia mesotelial e desenvolvem acidose peritoneal, que podem modular diretamente ou indiretamente a produção de citocinas e fatores de crescimento das células mesoteliais, macrófagos e fibroblastos²¹. Observou-se que o acréscimo de gás oxigênio (O₂) ao CO₂ insuflado diminuiu o número de aderências peritoneais²². Raros estudos comparam a ação fibrinolítica do peritônio entre as cirurgias abertas e laparoscópicas em seres humanos.

1.3 PERITONITE

Muitos autores demonstraram que a inflamação peritoneal é uma causa de aderência peritoneal. A presença de bactérias na cavidade peritoneal desencadeia a ativação da cascata de coagulação, reduz a atividade fibrinolítica e resulta na formação de aderência.

Ince *et al.* e vanGoor *et al.* estudaram as atividades coagulatória e fibrinolítica no peritônio humano em condições de normais e sob peritonite e observaram diminuição da atividade fibrinolítica em biópsia de peritônio com peritonite em consequência do decréscimo da expressão do tPA e aumento da expressão do PAI-1 e PAI-2^{23,24}.

Frente à carência de estudos que relacionem a peritonite e o pneumoperitônio na formação de aderência peritoneal, este estudo foi desenvolvido a partir de um modelo de aderência já proposto em estudo anterior⁷.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito da laparoscopia e da peritonite bacteriana na formação de aderência epíplon-peritoneais sobre a película de silicone implantada no peritônio de ratos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar quantitativamente e qualitativamente as aderências peritoneais decorrentes da laparoscopia e laparotomia convencional nas situações com e sem peritonite aguda bacteriana em ratos.

3 MATERIAIS E MÉTODO

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo experimental controlado em modelo animal com peritonite aguda, utilizando técnica de laparoscopia e laparotomia convencional.

3.2 AMOSTRA

Foram utilizados 40 ratos machos, da linhagem Wistar, precedentes do Biotério da Universidade Estadual de Maringá (UEM), com peso médio de 369 g(321-443), que permaneceram 7 dias, no mínimo, em adaptação no Biotério do Hospital Universitário de Londrina(HUL) da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

Os animais foram mantidos confinados no Biotério do HUL-UEL, alojados em gaiolas de polipropileno, medindo 33X40X18 centímetros (cm) com maravalha, em ambiente padrão de temperatura ($22^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$) e luminosidade (ciclo de 12 horas claro/escuro), recebendo dieta sólida e água *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram realizados no Laboratório do Biotério do HUL-UEL. Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, no momento da inoculação peritoneal, em quatro grupos experimentais (n=10/grupo) (figura1):

Grupo Controle (Co)

Grupo CoLC: Animais sem peritonite bacteriana que receberam o implante da película de silicone pela técnica de laparotomia convencional.

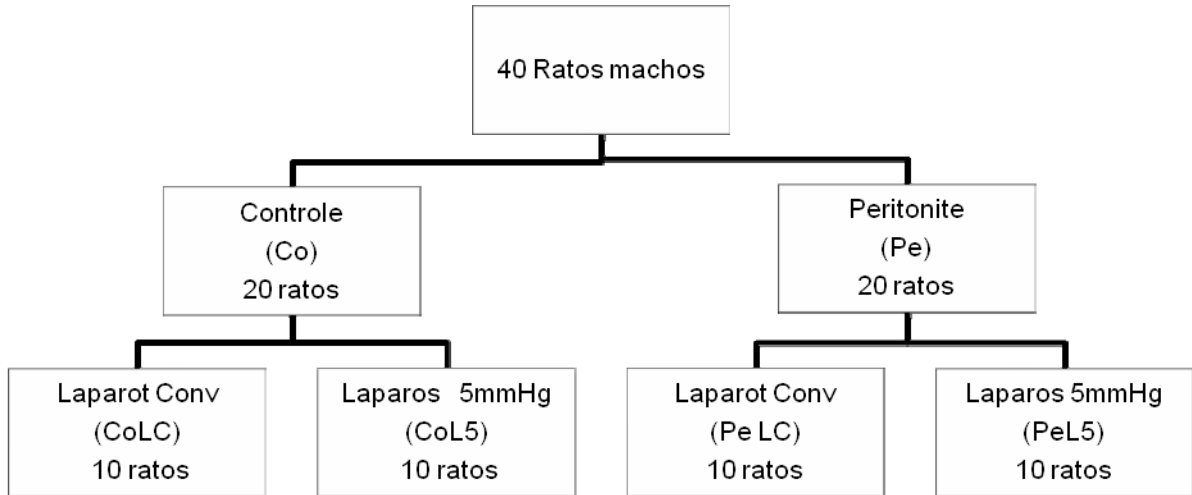
Grupo CoL5: Animais sem peritonite bacteriana que receberam o implante da película de silicone pela técnica de laparoscopia a 5 mmHg.

Grupo Peritonite (Pe)

Grupo PeLC: Animais com peritonite bacteriana que receberam o implante da película de silicone pela técnica de laparotomia convencional.

Grupo PeL5: Animais com peritonite bacteriana que receberam o implante da película de silicone pela técnica de laparoscopia a 5 mmHg.

Figura 1 – Organograma representativo da distribuição dos ratos nos grupos CoLC, CoL5, PeLC e PeL5

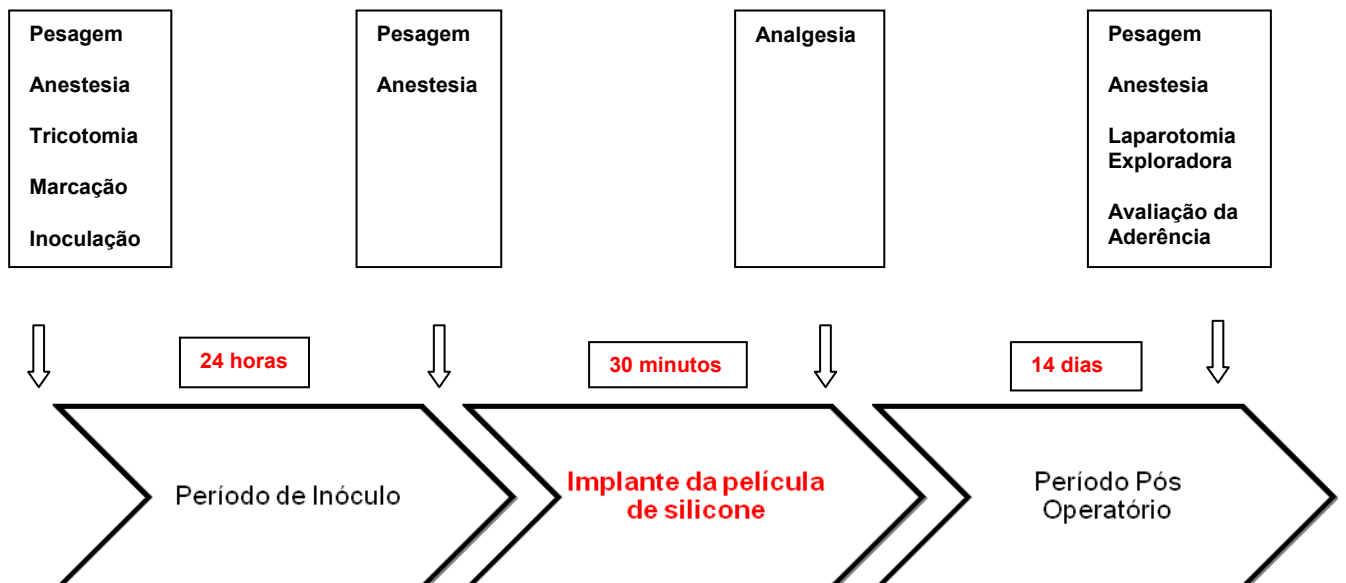


3.3 PROCEDIMENTOS

O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da UEL, processo n° 67/10 (Anexo A).

Os seguintes procedimentos foram realizados conforme o esquema da figura 2:

Figura 2 – Cronograma dos procedimentos cirúrgicos



3.3.1 Obtenção da Bactéria

A bactéria utilizada como inóculo bacteriano foi a *Escherichia coli* ATCC 25922 (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) inicialmente na forma liofilizada. O disco com *Escherichia coli* foi reconstituído e hidratado em meio de cultura com 1 ml de Brain Heart Infusion, incubado a 36°Celsius, durante 24 horas. Após este período, o material foi semeado em placa contendo Agar-MacConckey, incubado a 36°Celsius, durante 24 horas e mantido em solução de estoque. Para a preparação do inóculo bacteriano, foi obtida uma suspensão das bactérias em solução salina, recuperada a partir da solução de estoque, respeitando a fase logarítmica de crescimento. A aferição da concentração foi feita por meio de espectrofotômetro, que avalia a turvação da solução, segundo a escala de MacFarland. Esta aferição foi confirmada com diluições seriadas e contagem manual. O inóculo foi padronizado na concentração de 10^4 UFC/ml para os grupos onde a peritonite foi induzida.

3.3.2 Anestesia e Inoculação

Todos os animais foram pesados e submetidos à anestesia com uma solução de cloridrato de Ketamina 10% (Dopalen®) na dose de 60mg/kg e cloridrato de Xilazina 2% (Anasedan®) 10mg/kg, intramuscular. Doses subsequentes, com a metade da dose inicial de Ketamina foram realizadas para a manutenção da anestesia, de acordo com a necessidade. Para verificação do plano anestésico foram utilizados parâmetros de relaxamento muscular avaliado pelo relaxamento mandibular, reflexo podal (ausência de reflexo da retirada ao estímulo doloroso realizado pelo pinçamento das patas) e reflexo caudal (ausência de resposta motora ao pinçamento da cauda do rato).

Realizou-se a tricotomia tóraco abdominal com tricótomo elétrico e os animais foram novamente pesados, sendo considerado, o peso pré-inoculação.

Os animais receberam, após antissepsia com solução de iodopovidona tópica, injeção transparietal (1ml/100g p.c.) na linha mediana a 2 cm cranial ao óstio uretral na cavidade peritoneal de inóculo bacteriano (grupo Pe) e de solução fisiológica 0,9% (grupo Co) (figura 3). Após a inoculação, os ratos foram

colocados individualmente nas gaiolas por aproximadamente 24 horas, e este período foi chamado de período de inóculo.

Figura 3 – Indução da peritonite – punção transparietal abdominal seguida de injeção inóculo de E.coli(Grupo Pe) ou SF0,9%(Grupo Co)



3.3.3 Implante de Película de Silicone

Após o término do período de inóculo, os animais foram pesados, anestesiados e fixados em uma prancha de madeira, na posição de decúbito dorsal horizontal, com fixação dos membros anteriores e posteriores. Foi realizada antisepsia com iodopovidona tópico, colocado campos cirúrgicos fenestrados estéreis e realizada infusão de 15 ml de SF0,9%, por punção transparietal em linha média a 2 cm cranial ao óstio uretral e foi basculado o abdômen para homogeneização do líquido peritoneal. Nos animais dos grupos CoL5 e PeL5, foi realizada abertura da pele em quadrante inferior esquerdo, a 2 cm lateral da linha média, e dissecação de parede plano por plano até peritônio parietal. Foi realizada peritoniotomia e aspirado 5 ml de líquido peritoneal, para quantificação dos leucócitos e, em seguida, foi introduzido cistoscópio pediátrico 8Fr com óptica 3mm, 0 grau(Storz®), sob visão direta e fixado na parede abdominal com fio algodão 4-0 Ethicon®. Entre o insuflador de CO₂ e o cistoscópio foi instalado filtro Pharma Mini Portal Flex (Pharma System®) estéril dotado de microporos. A insuflação de gás carbônico com foi realizada com fluxo 1L/min à pressão de 5 mmHg e acionado cronômetro. Realizado incisão transversa de 5mm, abaixo do apêndice xifoide, dissecado plano muscular, até peritônio e introduzido trocarte 5mm (Ethicon®), sob visão laparoscópica (Figura 4). Em seguida, foi realizado o inventário da cavidade e

localizada a artéria epigástrica direita. A película de silicone estéril (1x5x5mm) Silimed®, já fixada com fio mononylon 5-0 (Ethicon®) no ponto central, foi introduzida por meio de porta agulha laparoscópico 5mm EDLO®, através de trocarte infra-apêndice xifoide (Figura 5).

Figura 4 – Pneumoperitônio instalado a pressão de 5mmHg - Cistoscópio pediátrico e Trocart 5mm posicionados



Figura 5 – Introdução da película de silicone na cavidade com porta agulha laparoscópico



Através da transiluminação da parede abdominal, foi conferida a posição da artéria epigástrica direita na pele do rato, realizada a incisão transversal na pele (3 mm), lateral a este vaso e, em seguida, dissecado plano muscular. O peritônio foi puncionado neste local com agulha Cater-Thomas modificada (Figura 6). O fio mononylon 5-0, fixado na película de silicone, foi tracionado, através da haste interna da agulha e exteriorizado pelo orifício na parede. A película foi acomodada, lateralmente ao vaso epigástrico direito e após a confirmação da ausência de epíplon entre peritônio e película, o fio da película foi fixado no fio mononylon 5-0 (Ethicon®) da sutura da musculatura abdominal (Figura 7). O pneumoperitônio foi mantido a 5 mmHg por 30 minutos. Retirado porta agulha e trocarte infra-apêndice xifoide sob visão laparoscópica. Retirado óptica e cistoscópio pediátrico, sob visão

direta e desinstalado o pneumoperitônio. A síntese da parede foi realizada com pontos contínuos de fio mononylon 5-0 (Ethicon®), no plano peritônio-muscular e pontos separados na pele. No final do procedimento foi realizado analgesia com buprenorfina injetável 0,3mg/ml (Temgisec®) na dose 0,05mg/kg, via sub cutânea, dose única no POI.

Figura 6 – Punção transparietal em quadrante inferior a esquerda com agulha de Cater-Thomas modificada

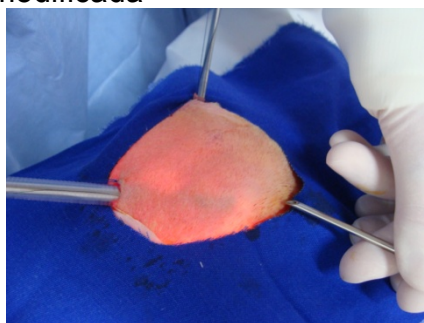
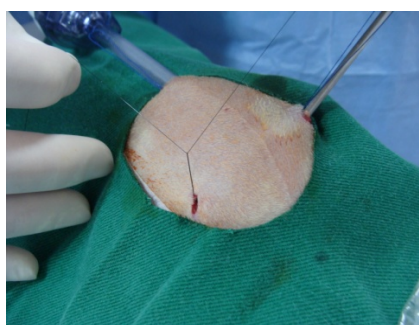


Figura 7 – Fixação da película de silicone na parede abdominal



Nos animais dos grupos CoLC e PeLC foram realizados os mesmos procedimentos até infusão do soro fisiológico na cavidade peritoneal descritos anteriormente. Foi realizada incisão mediana de 1,5cm, a 2cm acima do óstio uretral; dissecado parede plano por plano até cavidade peritoneal, acionado cronômetro para controle do tempo de cirurgia e 5ml de líquido peritoneal foi colhido. Após, localizada a artéria epigástrica direita, por visão direta, foi conferida a posição deste vaso na pele por transiluminação e realizada incisão (3mm) na pele, lateral ao vaso. Após a dissecação do plano muscular, realizou-se punção transparietal com agulha descartável estéril 40x12mm BD®, lateral ao vaso, passado o fio mononylon 5-0 (Ethicon®), previamente ancorado na película, pelo lúmen da agulha e exteriorizado o mesmo através do orifício na parede abdominal (Figura 8). O fio foi tracionado, a

película de silicone foi acomodada no peritônio e fixado o fio da mesma maneira dos grupos CoL5 e PeL5 (Figura 9). A cavidade peritoneal foi mantida aberta por 30 minutos. Em seguida, a parede foi fechada e analgesia realizada da mesma forma que nos grupos CoL5 e PeL5.

Figura 8 – Implante da película de silicone pela técnica de laparotomia convencional

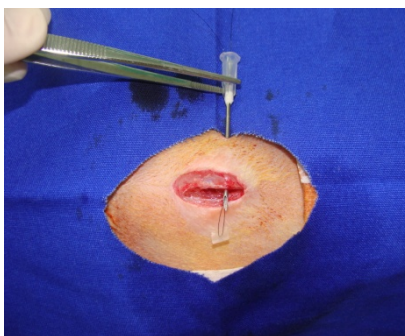
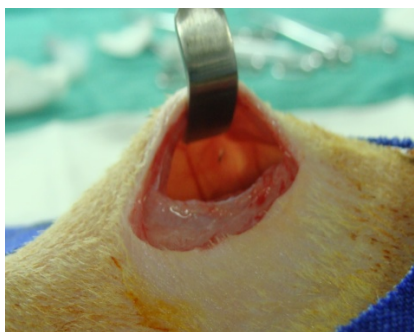


Figura 9 – Película acomodada na face peritoneal da parede abdominal



3.3.4 Laparotomia Exploratória e Avaliação Macroscópica

No décimo quarto dia de pós-operatório, sob efeito de anestesia, os ratos foram pesados e submetidos à laparotomia exploradora por incisão subcostal bilateral (Figura 10). Foi avaliada a quantidade de aderência no sítio cirúrgico e nos orifícios de acesso cirúrgico. Realizou-se a eversão da parede abdominal que continha a película de silicone, colocado sobre fonte luminosa e foram obtidas imagens digitais, com máquina Sony® DSC-H3 (Figura 11).

Figura 10 – Laparotomia exploradora - Incisão subcostal bilateral (linha)

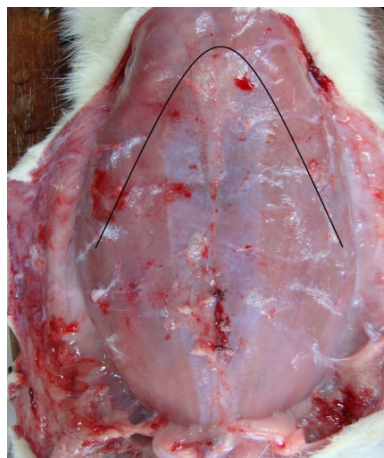
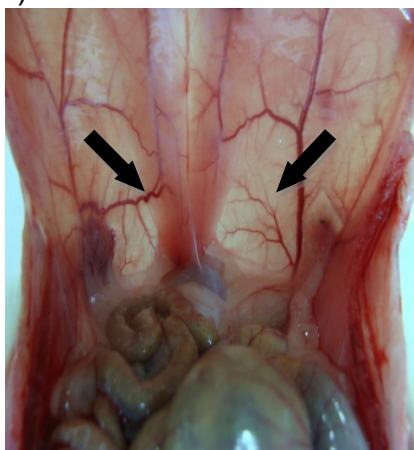


Figura 11 – Avaliação macroscópica das aderências no sítio cirúrgico e incisão cirúrgica (setas)



O fragmento peritônio-muscular de 2X2 cm, que continha o implante de silicone foi ressecado e a epipléctomia, foi realizada, quando necessário. Os fragmentos foram visualizados e fotografados em aumento de 20x e 40x, através de Lupa Carl Zeiss® (Figura 12). O software BelView® foi utilizado para o cálculo dos diâmetros dos vasos dos fragmentos (Figura 13). As imagens digitalizadas foram utilizadas para mapear as aéreas neovascularizadas e de adesão. Foi realizada avaliação, duplo cega, da qualidade das aderências epíplon-peritoneais sobre a película, conforme os critérios de adesão de Diamond modificado (Anexo B), onde a pontuação é realizada de acordo com a tenacidade, tipo e extensão. A tenacidade é avaliada pela resistência ao tentar soltar a aderência da película: ausente (0), solta parcialmente (1), solta com tração (2) ou solta com dissecção fina (3). O tipo da adesão é avaliado pelo aspecto da aderência sobre a película: ausente (0), fina (1),

densa sem vaso (2), densa com vasos pequenos(<50 μ m) (3) e densa com vasos grandes(50-100 μ m) (4). O critério de escolha do diâmetro do vaso foi o maior diâmetro do vaso de maior comprimento encontrado na aderência sob visão com aumento de 40x. A extensão é avaliada pela porcentagem da área da película coberta pela aderência epíplon peritoneal: sem aderência (0), menor que 25% (1), entre 25 e 50% (2), entre 50 e 75% (3) e maior que 75% (4). A pontuação total da adesão é resultado da soma das três escalas, que varia de 0 a 11.

As peças cirúrgicas foram armazenadas e fixadas em solução de formol a 10%.

Figura 12 – Avaliação da extensão ocupada pela aderência sobre a película

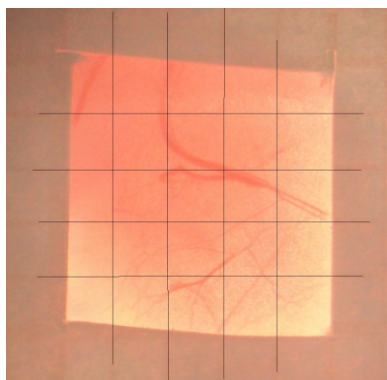
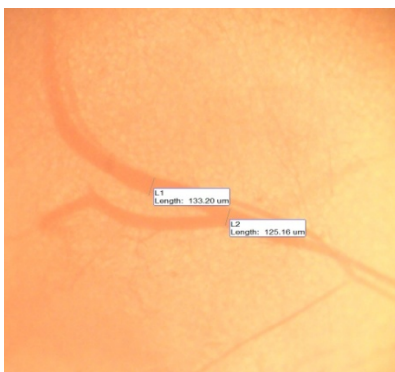


Figura 13 – Medição do maior diâmetro do vaso de maior comprimento



3.4 IMUNOHISTOQUÍMICA

Todas as peças cirúrgicas contendo a película de silicone foram fixadas em formol 10%, emblocadas em parafina, submetidas a cortes histológicos de 4 μ m de espessura e suspensos em lâminas silanizadas. A recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão, com as lâminas imersas em solução

tampão EDTA a 4% durante 1 minuto e 12 segundos seguido de resfriamento das lâminas em temperatura ambiente por pelo menos 20 minutos. Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se o peróxido de hidrogênio a 10%, imergindo as lâminas durante 10 minutos e após lavagem em solução salina tamponada de fosfatos (PBS, pH 7,4). Foi utilizado anticorpo policlonal de coelho anti-CD34 (bs-0646R, Bioss[®], 1:200). O anticorpo primário foi aplicado diluído em soroalbumina bovina (BSA) a 1%, na concentração referida acima, sendo incubado pernoite em câmara úmida a 4%. Em seguida as lâminas foram lavadas em PBS por 30 minutos, sendo colocado como anticorpo secundário o polímero (polydetector), por 30 minutos. A reação final foi revelada imergindo as lâminas em 3,3-diaminobenzidina tetra-hidroclorido (DAB) por 5 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas em água corrente e contracoradas pela hematoxilina de Harris por 5 minutos, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, imersas em xilol e montadas utilizando lamínulas.

3.4.1 Imagem e Microdensidade Vascular (MDV)

A área avaliada foi a interface película-peritônio parietal por fornecer tenacidade e reprodutibilidade entre todas as amostras (Figura 14). As cinco primeiras imagens microscópicas com vasos corados pela imunohistoquímica foram captadas por uma câmera digital acoplada ao microscópio óptico do Laboratório de Biologia da Reprodução do Departamento de Biologia Geral do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da UEL, em aumento de 100X (Figura 15). O programa de captura e armazenamento das imagens foi Bel View[®]. A microdensidade vascular foi avaliada através da análise das imagens digitais através do programa Image J (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA).

Figura 14 – Imagem a microscopia óptica com aumento 40X da interface película peritônio (seta). Imunohistoquímica com anticorpo antiCD34

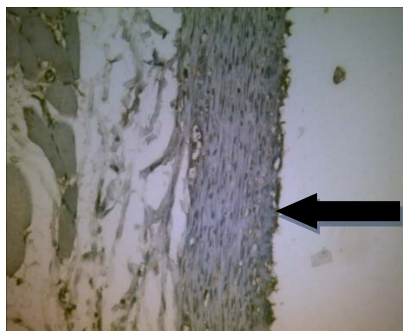


Figura 15 – Imagens de endotélio marcado com anticorpo anti CD-34 (setas) em aumento de 100X



As imagens colorida foram convertidas em imagens de 8 bits (Figura 16) em escala cinza e através da ferramenta “threshold” foram limitadas as áreas coradas pelo anticorpo CD34 (Figura 17). As áreas limitadas foram expressas em cor preta e o restante da área digital permaneceu de cor branca (Figura 18). Através da ferramenta “medidas” do item “análise”, da barra de ferramentas, calculou-se a porcentagem da área limitada em relação ao restante; denominada MDV. Os resultados foram apresentados como a média de cinco medições para cada animal.

Figura 16 – Imagem convertida para 8 bits, representada em tons de cinza

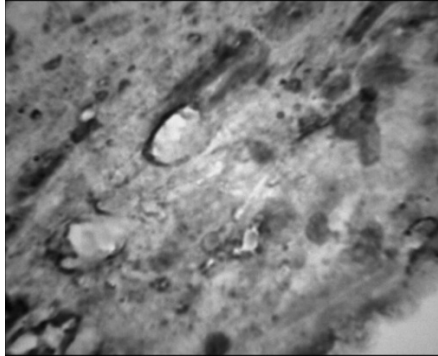


Figura 17 – Imagem com área endotelial limitada (vermelho)

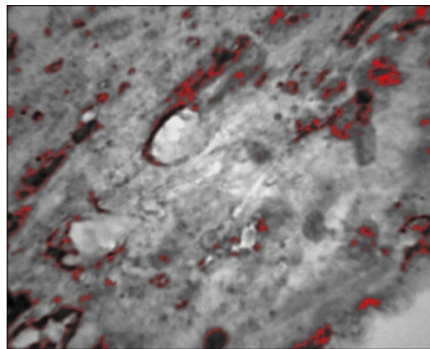
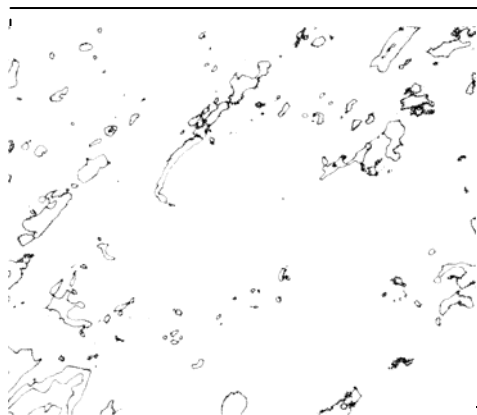


Figura 18 – Imagem utilizada para o cálculo da porcentagem de área dos vasos em relação ao fundo (MVD)



3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram armazenados no programa Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, EUA) e analisados no programa SPSS Statistics® versão 17.0, release 17.01 (2008, Polar Engineering and Consulting).

Todos os dados foram apresentados por meio de média e desvio padrão. O teste de ANOVA foi utilizado para detectar diferenças gerais entre os grupos para as variáveis quantitativas. Os testes de Kruskal-Wallis e qui-quadrado foram utilizados para verificar se há diferença entre os escores e presença de epíplon na película, respectivamente. Para verificar se houve diferença estatisticamente significativa entre a contagem de leucócitos dos ratos com peritonite e controle foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. O nível de significância utilizado foi de 5%, ou seja, $p \leq 5\%$.

4 RESULTADOS/DISCUSSÃO

“In God we trust; all others must bring data”. W. Edwards Deming

Comparison of peritoneal adhesions post laparoscopy and laparotomy convencional in model of experimental peritonitis in rats¹.

Comparação das aderências peritoneais após laparoscopia e laparotomia convencional em modelo experimental de peritonite em ratos.

Ricardo Silva Parreira², Marco Aurélio de Freitas Rodrigues³, Suzana de Fátima Paccola Mesquita⁴, Eloá Lumi Miranda⁵, Fernanda Burle dos Santos Guimarães⁶

Resumo: Objetivo: Comparar a quantitativamente e qualitativamente as aderências peritoneais após laparoscopia e laparotomia convencional na vigência de peritonite bacteriana, em modelo experimental aderência já existente.

Método: Foram utilizados 40 ratos machos, da linhagem Wistar, distribuídos aleatoriamente, em quatro grupos (n=10/grupo): CoLC, CoL5, PeLC e PeL5. A peritonite bacteriana (Pe) foi estimulada pela inoculação de *Escherichia coli* ATCC 25922 na concentração de 10⁴ UFC/ml, por punção transparietal. Após 24 horas os animais foram submetidos às cirurgias de implante de película de silicone lateral a artéria epigástrica direita, por técnica aberta (CoLC e PeLC) ou laparoscópica (CoL5 e PeL5). No décimo quarto dia pós-cirúrgico os ratos foram submetidos à laparotomia exploradora e avaliação macro e microscópica das aderências. A avaliação qualitativa foi realizada através do escore de Diamond modificado, que avaliou a tenacidade, tipo e extensão da aderência; enquanto a microdensidade vascular (MDV) foi realizada pela análise de imagens de células endoteliais marcadas pelo anticorpo anti-CD34.

Resultados: A contagem de leucócitos do grupo Pe (23,53) foi superior ao grupo Co (16,29) (p=0,048). A presença de epíplon aderido na película não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos (p=0,395). Não há diferença estatisticamente significativa, entre os escores de aderência dos quatro grupos (p=0,849; p=0,379). A MDV dos grupos CoLC (3,66±0,73), CoL5(3,56±0,49),

¹ Trabalho realizado no Biotério do Hospital Universitário Regional do Norte do Paraná da Universidade Estadual de Londrina

² Mestrando, UEL, Londrina-PR, Brasil. Concepção, delineamento, procedimentos técnicos, aquisição e interpretação dos dados, redação do manuscrito.

³ Professor Doutor, Disciplina de Urologia, UEL, Londrina-PR, Brasil. Revisão crítica.

⁴ Professor Doutor, Departamento de Biologia Geral, UEL, Londrina-PR. Interpretação de dados, revisão crítica.

⁵ Aluno da Graduação de Medicina, UEL, Londrina-PR, Brasil. Procedimentos técnicos.

⁶ Artigo é parte da dissertação de tese, nível mestrado, cujo orientador é o autor II.

PeLC ($3,40 \pm 0,59$) e PeL5 ($3,53 \pm 0,40$) não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p=0,775$).

Conclusão: A quantidade e qualidade das aderências peritoneais foram iguais tanto na laparotomia convencional quanto na laparoscopia, pelos critérios de avaliação utilizados, independentemente de existir ou não peritonite.

Palavras Chave: aderência, peritônio, laparoscopia, peritonite, ratos, MVD, implante película silicone.

Introdução

A aderência peritoneal pode ser definida como junção estável entre duas ou mais estruturas peritoneais, que normalmente encontram-se separadas, decorrente de alguma situação anormal na cavidade peritoneal.

O peritônio, composto por três camadas: mesotélio, lâmina basal e sub mesotélio, é a maior membrana serosa do corpo, reveste totalmente a cavidade abdominal e pélvica, exceto os ovários; e tem como função proteger os órgãos destas cavidades¹. A lesão do peritônio por causas mecânica, térmica ou infecciosa, desencadeia ativação inflamatória, da cascata de coagulação sanguínea e do sistema fibrinolítico local. O equilíbrio entre a ação do sistema fibrinogênico e fibrinolítico determina a formação e modelagem das aderências peritoneais².

As aderências estão presentes em 10% dos casos de pacientes sem cirurgia prévia e em 90% no grupo de pacientes pós cirúrgico³. Dor abdominal, obstrução intestinal e infertilidade feminina são as complicações mais comuns das aderências³⁻⁵. A aderência peritoneal é responsável por 65-75% das obstruções do intestino delgado, mais de 20% dos casos da infertilidade feminina secundária e 40% das causas de dor abdominal baixa em pacientes submetidos à cirurgia, o que representa um elevado custo ao sistema de saúde^{3,5-12}.

O acesso laparoscópico no tratamento das afecções abdominoperitoneais tem sido amplamente utilizado, mesmo em condições de peritonite. Embora a laparoscopia apresente vantagens em relação à laparotomia, estudos tem provado que esta técnica cirúrgica não é isenta de danos ao peritônio, pois provoca hipóxia e dissecação peritoneal, que predispõem a formação de aderências¹³. O gás mais utilizado para realização do pneumoperitônio é o dióxido de carbono (CO_2), mas já se sabe que este gás afeta a morfologia e a homeostase peritoneal.

A peritonite bacteriana é um fator predisponente à formação da aderência peritoneal. A presença de bactérias na cavidade peritoneal desencadeia a ativação da cascata de coagulação e reduz a atividade fibrinolítica¹⁴.

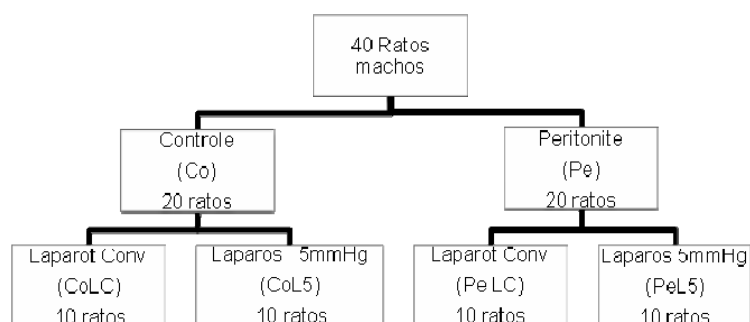
Considerando a ausência de estudos experimentais que relacionem a peritonite e o pneumoperitônio na formação de aderência peritoneal, este estudo tem como objetivo comparar a ação destes dois fatores na formação das aderências sobre o sítio cirúrgico, após o implante da película de silicone.

Método

Modelo de Adesão

O protocolo experimental deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal da Universidade Estadual de Londrina (CEUA-UEL) n°65/12. Foram utilizados 40 ratos machos da linhagem Wistar com peso médio de 369(321-443)g. Os animais foram distribuídos aleatoriamente, em quatro grupos experimentais (n=10/grupo), no momento da inoculação peritoneal: CoLC, sem peritonite bacteriana e submetidos à laparotomia convencional para o implante da película de silicone; CoL5, sem peritonite bacteriana e submetidos à laparoscopia a 5mmHg para o implante da película de silicone; PeLC, com peritonite bacteriana e submetidos à laparotomia convencional para o implante da película de silicone e PeL5, com peritonite bacteriana e submetidos à laparoscopia a 5mmHg para o implante da película de silicone (Figura 1).

Figura 1 – Organograma representativo da distribuição dos ratos nos grupos CoLC, CoL5, PeLC e PeL5



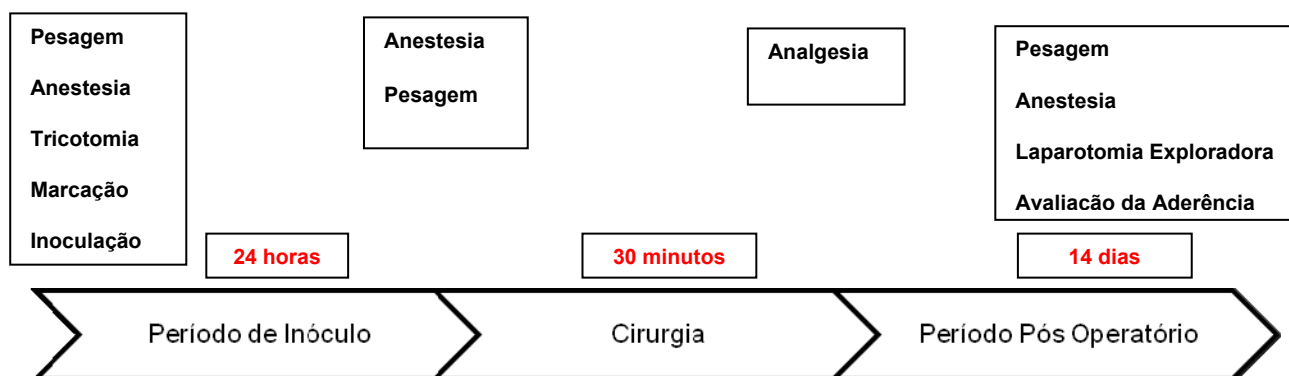
Os procedimentos foram realizados conforme esquema da figura 2.

Anestesia e inoculação peritoneal:

O inóculo foi preparado com bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922 (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) e padronizado na concentração de 10^4 CFU/ml.

Os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de Ketamina 10%-Dopalen® (Vetbrand, SP, Brasil) 60mg/kg e Xilazina 2%-Anasedan® (Vetbrand, SP, Brasil) 10mg/kg, via intramuscular.

Figura 2 – Cronograma dos procedimentos cirúrgicos



A peritonite foi induzida por injeção transparietal do inóculo bacteriano (1ml/100 g p.c.), grupo peritonite e de SF 0.9%, no grupo controle. Os ratos permaneceram em observação por 24 horas, período este, denominado tempo de inóculo.

Implante da película:

Todos os procedimentos cirúrgicos foram realizados pelo mesmo cirurgião, sob condições estéreis, dois ratos por dia, um por laparotomia convencional e outro por laparoscopia. Foi realizada infusão de 15 ml de solução salina, pela mesma técnica da inoculação, seguido de basculagem e coletado 5 ml do líquido peritoneal no momento da abertura do peritônio para dosagem de leucócitos.

Nos animais dos grupos CoL5 e PeL5, realizou-se incisão em quadrante inferior esquerdo, a 2cm da linha média, dissecação de parede plano por plano até peritônio parietal, peritoniotomia e introdução de cistoscópio pediátrico 8Fr conectado à óptica 3mm, 0 grau (Storz®), sob visão direta. O filtro Pharma Mini

Portal Flex (Pharma System, Swedan) foi instalado entre o insuflador e o cistoscópio e insuflado CO₂ com fluxo 1L/min à pressão de 5 mmHg. Trocarte 5mm (Ethicon®) foi passado abaixo do apêndice xifoide e introduzido película de silicone estéril de 1x5x5mm (Silimed®, Rio de Janeiro, Brasil) fixada com fio mononylon 5-0 (Ethicon®) em ponto central. Após, localizada artéria epigástrica direita e sua posição na pele por transiluminação, foi feita incisão a pele lateral à artéria. O peritônio foi puncionado com agulha Cater-Thomas modificada; o fio foi tracionado, exteriorizado e a película acomodada lateralmente ao vaso epigástrico direito. Após a verificação da ausência de epíplon entre a película e o peritônio, o fio da película foi fixado na parede abdominal e pneumoperitônio foi mantido por 30 minutos. Após a retirada dos instrumentais cirúrgicos sob visão laparoscópica o pneumoperitônio foi desinstalado.

Nos animais dos grupos CoLC e PeLC realizou-se incisão mediana de 1,5cm, a 2cm acima do óstio uretral e, em seguida, a artéria epigástrica direita foi localizada e conferida sua posição na pele por transiluminação. Após a incisão da pele, lateralmente ao vaso, foi realizada a punção da parede abdominal com agulha descartável BD® 40x12mm. A película de silicone foi fixada na parede da mesma forma que na técnica laparoscópica. A cavidade peritoneal foi mantida aberta por 30 minutos.

Em ambas as técnicas foram realizadas as sínteses de parede com pontos de mononylon ethilon 5-0 (Ethicon®), em dois planos, peritônio-muscular com pontos contínuos e pele com pontos separados.

Após analgesia com buprenorfina injetável 0,3mg/ml (Temgisec®) na dose única de 0,05mg/Kg, via sub cutânea, os animais retornaram às gaiolas originais.

Quantificação das Adesões Intra abdominais:

No décimo quarto dia de pós operatório foi realizada laparotomia exploratória para a avaliação da quantidade e qualidade das aderências peritoneais. Realizou-se a eversão da parede abdominal que continha a película de silicone, e foram obtidas imagens digitais, com máquina Sony® DSC-H3.

Os fragmentos foram visualizados e fotografados em aumento de 20x e 40x, através de Lupa Carl Zeiss®. O softwear BelView® foi utilizado para o cálculo dos diâmetros dos vasos desses fragmentos. As imagens digitalizadas forma utilizadas para mapear as aéreas neovascularizadas e de adesão. Foi realizada

avaliação, duplo cega, da qualidade das aderências epíplon-peritoneais sobre a película (escore da adesão), conforme os critérios de adesão de Diamond modificado, onde a pontuação é realizada de acordo com a tenacidade, tipo e extensão das aderências. A tenacidade é avaliada pela resistência ao tentar soltar a aderência da película: ausente (0), solta parcialmente (1), solta com tração (2) ou solta com dissecação fina (3). O tipo da adesão é avaliado pelo aspecto da aderência sobre a película: ausente (0), fina (1), densa sem vaso (2), densa com vasos pequenos (<50µm) (3) e densa com vasos grandes (50-100µm) (4). O critério de escolha do diâmetro do vaso foi o maior diâmetro do vaso de maior comprimento encontrado na aderência sob visão com aumento de 40x. A extensão é avaliada pela porcentagem da área da película coberta pela aderência epíplon peritoneal: sem aderência (0), menor que 25% (1), entre 25 e 50% (2), entre 50 e 75% (3) e maior que 75% (4). A pontuação total da adesão é resultado da soma das três escalas, que varia de 0 a 11.

As peças cirúrgicas foram fixadas em formol 10%, emblocadas em parafina, submetidas a cortes histológicos de 4µm de espessura e suspensos em lâminas silanizadas. A imunohistoquímica foi realizada com anticorpo policlonal de coelho anti-CD34 (bs-0646R, Bioss[®]), diluído em soroalbumina bovina (BSA), polímero (polydetector) e 3,3-diaminobenzidina tetra-hidroclorido (DAB).

Imagens e Micro Densidade Vascular (MDV):

A área avaliada foi a interface película-peritônio parietal por fornecer tenacidade e reprodutibilidade entre todas as amostras. As cinco primeiras imagens microscópicas que continham vasos corados pela imunohistoquímica foram capturadas por uma câmera digital acoplada ao microscópio óptico, em aumento de 100X. O programa de captura e armazenamento das imagens foi Bel View[®]. A MDV foi quantificada pela análise das imagens digitais pelo programa Image J (National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA). As imagens coloridas foram convertidas para escala de cinza e limitadas as áreas coradas pelo anticorpo anti-CD34, as quais passaram a ser expressas na cor preta e o restante da área digital na cor branca. Calculou-se a porcentagem da área limitada (MVD) em relação ao restante. Os resultados foram apresentados como a média de cinco medições para cada animal.

Os dados foram analisados no programa SPSS Statistics[®] versão 17.0, release 17.01 (2008, Polar Engineering and Consulting). Todas as variáveis

foram apresentadas por meio de média e desvio padrão. O teste de ANOVA foi utilizado para detectar diferenças gerais entre os grupos para as variáveis quantitativas em estudo. Os testes de Kruskal-Wallis e qui-quadrado foram utilizados para verificar se há diferença entre os escores e presença de epíplon na película, respectivamente. Para avaliação da contagem de leucócitos dos ratos com peritonite e controle foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. O nível de significância utilizado foi de 5%.

Resultados

O inóculo injetado (ml) no interior da cavidade peritoneal dos ratos não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os grupos CoLC(1,78 ±0,21), CoL5(1,88±0,18), PeLC(1,81 ±0,18) e PeL5(1,86 ±0,11) (p=0,502).

Não houve diferença estatisticamente significativa (p=0,659) nos pesos dos animais (g) à época da cirurgia, entre os grupos. CoLC (349,56±36,72), CoL5(360,40±29,53), PeLC(348,60±30,03) e PeL5(362,50±25,97).

O tempo de inoculação em minutos foi de CoLC(1429,56±100,46), CoL5(1446,70±84,06), PeLC(1471,3±64,58) e PeL5(1424,3±77,84), sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0,585).

O tempo de cirurgia em minutos foi de CoLC(28,44±2,92), CoL5(30±0), PeLC(30,4±2,41) e PeL5(29,4±2,68), sem diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0,294).

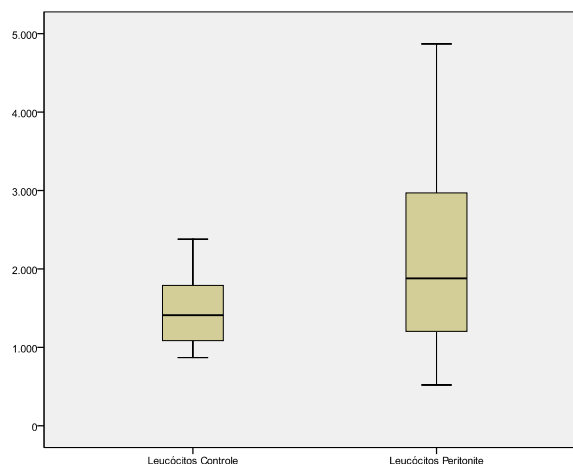
Tabela 1 – Resultados das médias, desvios padrões e ANOVA das variáveis quantitativas: Inóculo(mL), Tempo de inoculação(min), Peso corpóreo dos animais na cirurgia(g) e Tempo de cirurgia(min)

Subgrupo	Inóculo(ml)		Tempo Inoculação(min)		Peso Cirurgia(g)		Tempo Cirurgia(min)	
	Média	Desvio-Padrão	Média	Desvio-Padrão	Média	Desvio-Padrão	Média	Desvio-Padrão
CoLC	1,778	0,211	1.429,56	100,463	349,556	36,722	28,44	2,920
CoL5	1,880	0,132	1.446,70	84,057	360,400	29,534	30,00	0,000
PeLC	1,810	0,179	1.471,30	64,576	348,600	30,303	30,40	2,413
PeL5	1,860	0,108	1.424,30	77,838	362,500	25,967	29,40	2,675
p-valor	0,502		0,585		0,659		0,294	

A contagem de leucócitos (células/mm³) do grupo Pe(23,53) foi superior ao grupo Co(16,29)(p=0,048).

A presença de epíplon aderido na película não apresentou diferença estatisticamente significativa entre os 4 grupos ($p=0,395$).

Figura 3 – Contagem de leucócitos(células/mm³) no líquido peritoneal dos ratos do grupo Co e Pe



Não houve diferença estatisticamente significativa, entre os escores de aderência dos 4 grupos, tanto para o avaliador 1 ($p=0,849$) como para o avaliador 2($p=0,379$).

Tabela 2 – Resultados das avaliações do escore de aderência pelos avaliadores 1 e 2

	Escore aderência	
	Avaliador 1	Avaliador 2
Qui-Quadrado	0,8	3,08
df	3	3
p valor	0,849	0,379

A MDV(%) dos grupos CoLC($3,66\pm 0,73$), CoL5($3,56\pm 0,49$), PeLC($3,40\pm 0,59$) e PeL5($3,53\pm 0,40$) não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p=0,775$).

Tabela 3 – Resultados da MDV(%) dos grupos CoLC, CoL5, PeLC e PeL5

Subgrupo	Densidade Vascular	
	Média	Desvio-Padrão
CoLC	3,664	0,730
CoL5	3,562	0,495
PeLC	3,396	0,586
PeL5	3,530	0,401
p-valor	0,775	

5 DISCUSSÃO

A distribuição normal e homogênea dos pesos dos ratos, dentro dos grupos, garantiu que as amostras apresentassem homogeneidade. Isto demonstra que os ratos eram semelhantes e dificilmente algum tipo de viés relacionado ao peso dos ratos ocorreu. Para esta homogeneidade, os ratos foram adquiridos com média de peso de 350 g no biotério da UEM, onde há rigoroso controle do peso dos ratos. Foi dispensado o cuidado de operar um rato de cada grupo a cada dois dias, de forma que o aumento de peso dos ratos seja semelhante nos quatro grupos.

Há quatro modelos experimentais de estímulo a peritonite por infecção intra-abdominal: inoculação de endotoxinas bacterianas, inoculação de material fecal de humanos ou de roedores (polimicrobiano), inoculação intraperitoneal com inóculo vivo monobacteriano e criação de uma fonte endógena de contaminação fecal, como ligadura e punção do ceco (LPC). Embora o modelo LPC seja o mais utilizado nos experimentos com peritonite bacteriana, o modelo utilizado neste experimento foi monobacteriano, devido necessidade de manter um estímulo infeccioso homogêneo em todos os ratos, além de ser um modelo simples, padronizado, de baixo custo e descrito na literatura¹⁵.

A *E.coli* foi utilizada, por ser a bactéria mais comum da flora gastrointestinal e a principal causadora de infecção na cavidade peritoneal. Optado pela baixa concentração de 10^4 UFC/ml devido à necessidade de promover resposta inflamatória peritoneal segura, com menor risco de sepse e óbito dos ratos durante o período pós-operatório. Boyne *et al.* encontraram a sobrevida de 70% dos ratos que tiveram a peritonite induzida por *E.coli* a 10^4 ou 10^5 UFC, 40% para 10^6 e 10% para 10^7 ou 10^8 ¹⁶. Houve morte de apenas um rato do grupo CoLC no primeiro dia de pós-operatório. Portanto, o modelo de estímulo de peritonite utilizado neste experimento mostrou-se seguro e satisfatório para objetivo do estudo.

O tempo inóculo estipulado foi de 24 horas, pois outros estudos demonstraram a presença de grande quantidade de leucócitos do tipo PMN na lesão peritoneal com 12 horas e pico em 48 horas após a agressão; além de favorecer a logística dos experimentos^{17,18}.

O tempo de cirurgia é um fator de risco pesquisado na formação de aderências peritoneais, pois altera a atividade fibrinolítica peritoneal. Brokelman *et al.* demonstraram que o aumento do tempo de pneumoperitônio diminui a atividade

do tPA e aumenta a concentração antigênica do PAI-1 peritoneal, principalmente com 90 minutos de pneumoperitônio¹⁹. Foi realizado o controle rigoroso do tempo de pneumoperitônio e cavidade aberta (gráfico 4 - anexo F), mas o curto período de trinta minutos de cirurgia, provavelmente não tenha sido suficiente para inibir o sistema fibrinolítico, conforme o resultado deste estudo.

Com objetivo de diferenciar a presença de inflamação peritoneal nos ratos do grupo controle e peritonite, optou-se por contagem de leucócitos a partir do lavado peritoneal com SF0,9%, devido o baixo custo e fácil acesso na prática experimental. Houve maior média de ranque no grupo peritonite em relação ao grupo controle, ou seja, os ratos submetidos à infusão do inóculo bacteriano apresentaram uma resposta inflamatória peritoneal maior que os ratos submetidos à infusão de SF0,9% (figura 3).

A avaliação das aderências peritoneais é de difícil realização, devido à ausência do consenso universal na nomenclatura e classificação destas estruturas^{13,20}. Vários modelos têm sido utilizados nos estudos experimentais, que medem a aderência pelo percentual de animais que desenvolvem algum tipo de aderência²¹; pela quantificação das aderências em um grupo de animais²²; ou por escalas subjetivas de graduação^{23,24}. Alguns autores avaliam através da quantificação da área aderida²⁵⁻²⁷.

Os modelos utilizados neste experimento para a avaliação das aderências peritoneais foram: avaliação macroscópica proposta por Bigatti *et al.* e a medição da MDV na interface película peritônio^{28,29}. A película de silicone estéril foi utilizada nos dois modelos previamente descritos, pois permite ao avaliador mensurar a quantidade e qualidade das aderências de forma mais exata e padronizada em todos os animais e torna a avaliação mais objetiva. Observou-se durante a avaliação dos critérios do score, que o critério tipo, do score de aderência, foi o que mais apresentou diferença entre os ratos, devido à objetividade da mensuração do diâmetro do vaso, ao contrário dos outros dois critérios.

O biomarcador CD34 é uma glicoproteína transmembrana de 105-120-kD que possui alta especificidade para as células endoteliais de vasos sanguíneos e precursores de células hematopoiéticas. O CD34 atua como sítio de adesão para as L-selectinas ou moléculas de adesão de leucócitos tipo 1(LAM-1), que se expressam na maioria dos tipos de leucócitos e participa da transmigração leucocitária nos processos inflamatórios. A maioria dos trabalhos tem utilizado os

anticorpos anti-CD34 para pesquisa de neovascularização em processos neoplásicos, como fator prognóstico destas lesões³⁰. Epstein *et al.* evidenciaram o CD34 como um bom marcador imunohistoquímico da angiogênese na formação da aderência peritoneal³¹. Realizou-se marcação imunohistoquímica com anticorpos anti-CD34 e anti-CD31 durante os experimentos, mas a qualidade inferior da marcação endotelial por este biomarcador não permitiu a delimitação dos vasos pelo softwear Image J e, por este motivo, foi optado pelo uso daquele biomarcador. A quantificação das imagens digitais imunomarcadas a partir do softwear Image J tem sido utilizada no meio científico com boa aceitação³². A avaliação da MDV pelo softwear, embora tenha sido um método complexo, mostrou-se bastante objetivo e adequado para a quantificação dos vasos marcados pelos anticorpos anti-CD34.

Os resultados apresentados neste estudo não evidenciaram diferença estatisticamente significativa entre os grupos, quando avaliado segundo o escore de aderência de Bigatti e pela MDV. Este resultado corrobora com cinco estudos experimentais descritos por Gutt *et al.* em revisão literária sobre aderência peritoneal após laparoscopia e laparotomia convencional entre 1987 e 2001 mas discorda de seis estudos experimentais, que demonstraram menor incidência de aderência no sítio cirúrgico após a laparoscopia¹³. Jacobi *et al.* evidenciaram que em condições de peritonite, a formação de aderência é a mesma após ressecção retal laparoscópica e aberta²². Caínzos *et al.* demonstraram que, além de maior incidência de aderência após colecistectomia convencional, aderências múltiplas foram mais comuns em relação ao grupo operado por laparoscopia³³.

O método experimental utilizado é seguro e eficiente na indução de aderência peritoneal, pois trinta e nove dos quarenta ratos permaneceram vivos durante o período pós – operatório e todos apresentaram aderência sobre a película. A baixa concentração de E.coli utilizada para induzir a peritonite, juntamente com a baixa pressão utilizada no pneumoperitônio e o tempo cirúrgico de 30 minutos, podem ser os responsáveis pela ausência de diferença na formação de aderência peritoneal entre os grupos. Foram utilizados baixos parâmetros de concentração da bactéria, pressão de pneumoperitônio e tempo cirúrgico, com objetivo de manter os ratos vivos, que provavelmente não promoveram alterações peritoneais, suficientemente significativas, para gerarem respostas diferentes nos grupos.

Conclui-se com este trabalho que, pelos critérios de avaliação utilizados, a quantidade e qualidade das aderências peritoneais foram iguais tanto

na laparotomia convencional quanto na laparoscopia, independentemente de existir ou não peritonite.

REFERÊNCIAS

1. BROKELMAN, W. J. A.; LENSVELT, M.; BOREL RINKES, I. H. M.; KLINKENBIJL; REIJNEN, M. M. P.J. Peritoneal changes due to laparoscopic surgery. *Surgical Endoscopy*, v. 25, p. 1-9, 2011.
2. MONK, B. J.; BERMAN, M. L.; MONTZ, F. J. Adhesions after extensive gynecologic surgery: clinical significance, etiology and prevention. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, v. 170, p. 1396–1403, 1994.
3. ELLIS, H. The clinical significance of adhesions: focus on intestinal obstruction. *European Journal of Surgery Supplement*. 1997; p. 577:5–9.
4. ELLIS, H.; MORAN, B. J.; THOMPSON, J. N.; PARKER, M. C.; WILSON, M. S.; MENZIES, D.; MCGUIRE, A.; LOWER, A. M.; HAWTHORN, R. J. S.; O'BRIEN, F.; BUCHAN, S.; CROWE, A. M. Adhesion-related hospital readmissions after abdominal and pelvic surgery: a retrospective cohort study. *Lancet*, v. 353, p. 1476 –1480, 1999.
5. KOSSI, J. Population-based study of the surgical workload and economic impact of bowel obstruction caused by postoperative adhesions. *British Journal of Surgery*, v. 90, p. 1441–1444, 2003.
6. MENZIES, D. Peritoneal adhesions. Incidence, cause, and prevention. *Surgery Annual*, v. 24, p. 27–45, 1992.
7. IVARSSON, M. L.; HOLMDAHL; FRANZEN, G.; RISBERG, B. Cost of bowel obstruction resulting from adhesions. *European Journal of Surgery*, v. 163, p. 679–684, 1997.
8. MENZIES, D.; ELLIS, H. Intestinal obstruction from adhesions: how big is the problem? *Ann R Coll Surg Engl.*, v. 72, p. 60–3, 1990.
9. MENZIES, D.; PARKER, M.; HOARE, R.; KNIGHT, A. Small bowel obstruction due to postoperative adhesions: treatment patterns and associated costs in 110 hospital admissions. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, v. 83, p. 40–46, 2001.
10. RAY, N. F.; DENTON, W. G.; THAMER, M; HENDERSON, S. C.; PERRY, S. Abdominal adhesiolysis: inpatient care and expenditures in the United States in 1994. *Journal of the American College of Surgeons*, v. 186, p. 1–9, 1998.
11. STOVALLI, T. G.; ELDER, R. F.; LING, F. W. Predictors of pelvic adhesions. *Journal of Reproductive Medicine*, v. 34, p. 345–8, 1989.

12. DIZEREGA, G. S. Biochemical events in peritoneal tissue repair. *European Journal of Surgery Supplements*, v. 577, p. 10–16, 1997.
13. GUTT, C. N.; ONIU, T.; SHEMMER, P.; MEHRABI, A.; BÜCHLER, W. Fewer adhesions induced by laparoscopy surgery? *Surgical Endoscopy*, v. 18, p. 898-906, 2004.
14. INCE, A.; EROGLU, A.; TARHAN, O.; BÜLBÜL, M. Peritoneal fibrinolytic activity in peritonitis. *The American Journal of Surgery*, v. 183, p. 67-69, 2002.
15. DEITCH, E. A. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock*, v. 24, n. 1, p. 19-23, 2005.
16. BUYNE, O. R.; BLEICHRODT, R. P.; VERWEIJ, P. E.; GROENEWOUD, H. M. M.; VANGOOR, H.; HENDRIKS, T. A peritonitis model with low mortality and persisting intra-abdominal abscesses. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, v. 87, p. 361-8, 2006.
17. RAFTERY, A. T. Regeneration of peritoneal and visceral peritoneum: na electron microscopical study. *Journal of Anatomy*, v. 115, p. 375-92, 1973.
18. DIZEREGA, G. S. Peritoneum, peritoneal healing, and adhesion formation. In: *Peritoneal Surgery*. ed diZerega, G. S.: Springer-Verlag, New York, 2000. p. 3-37.
19. BROKELMAN, W. J.; HOLMDAHL, L.; JANSSEN, I. M.; FALK, P.; BERGSTRÖM, M.; KLINKENBIJL, J. H.; REIJNEN, M. M. Decreased peritoneal tissue plasminogen activator during prolonged laparoscopic surgery. *Journal of Surgery Research*, v. 151, p. 89–93, 2008.
20. BIGATTI, G.; BOECKX, W.; GRUFT, L.; SEGERS, N.; BROSENS, I. Experimental model for neoangiogenesis in adhesion formation. *Human Reproduction*, v. 10, n. 9, p. 2290-94, 1995.
21. JORGENSEN, J. O.; LALAK, N. J.; HUNT, D. R. Is laparoscopy associated with a lower rate of postoperative adhesions than laparotomy? A comparative study in the rabbit. *Australian and New Zealand Journal of Surgery*, v. 65, p. 342–4, 1995.
22. JACOBI, C. A.; STERZEL, A.; BRAUMANN, C.; HALLE, E.; STOSSLEIN, R.; KRÄHNENBÜHL, L.; MULLER, J. M. The impact of conventional and laparoscopic colon resection (CO₂ or helium) on intraperitoneal adhesion formation in a rat peritonitis model. *Surgical Endoscopy*, v. 15, p. 380-6, 2001.

23. LUCIANO, A. A.; MAIER, D. B.; KOCH, E. I.; NULSEN, J. C.; WHITMAN, G. F. A comparative study of postoperative adhesions following laser surgery by laparoscopy versus laparotomy in the rabbit model. *Obstetrics & Gynecology*,; v. 74, p. 220–4, 1989.
24. MARANA, R.; LUCIANO, A. A.; MUZII, L.; MARENDINO, V. E.; MANCUSO, S. Laparoscopy versus laparotomy for ovarian conservative surgery: a randomized trial in the rabbit model. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, v. 171, p. 861–4, 1994.
25. FILMAR, S.; GOMEL, V.; MCCOMB, P. F. Operative laparoscopy versus open abdominal surgery: a comparative study on postoperative adhesion formation in the rat model. *Fertility and Sterility*, v. 48, p. 486–9, 1987.
26. GARRARD, C. L.; CLEMENTS, R. H.; NANNEY, L.; DAVIDSON, J. M.; RICHARDS, W. O. Adhesion formation is reduced after laparoscopic surgery. *Surgical Endoscopy*, v. 13, p. 10–3, 1999.
27. TITTEL, A.; TREUTNER, K. H.; TITKOVA, S.; OTTINGER, A.; SCHUMPELICK, V. Comparison of adhesion reformation after laparoscopic and conventional adhesiolysis in an animal model. *Langenbeck's Archives of Surgery*, v. 386, p. 141–5, 2001.
28. BIGATTI, G.; BOECKX, W.; GRUFT, L.; SEGERS, N.; BROSENS, I. Experimental model for neoangiogenesis in adhesion formation. *Human Reproduction*, v. 10, n. 9, p. 2290-4, 1995.
29. GREENE, A. K.; ALWAYN, I. P. J.; NOSE, V.; FLYNN, E.; SAMPSON, D.; ZURAKOWSKI, D.; FOLKMAN, J.; PUDER, M. Prevention of intra-abdominal adhesions using the antiangiogenic COX-2 inhibitor celecoxib. *Annals of Surgery*, v. 242, n. 1, p. 140-6, 2005.
30. JIANG, B.; MASON, J.; JEWETT, A.; CHO, W. C. S.; MAN, Y. Tube-Like Structures with Co-Expression of D2-40 and CD34: Newly Formed Vasculatures? *International Journal of Biological Sciences*, v. 8, p. 1206-16, 2012.
31. EPSTEIN, J. C.; WILSON, M. S.; WILKOSZ, S.; IRELAND, G.; DWYER, S. T. O.; HERRICK, S. E. Human Peritoneal Adhesions Show Evidence of Tissue Remodeling and Markers of Angiogenesis. *Diseases of the Colon & Rectum*, v. 49, n. 12, p. 1885-92, 2006.

32. OLIVEIRA, R. S. M. F.; OLIVEIRA, F. A. M.; PINHEIRO, H. S. Programando o software image j para a seleção automática de áreas marcadas por imunohistoquímica e coradas com o cromógeno DAB e contra-coradas pela hematoxilina. *Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais*, v. 2, n. 3, p. 76–80, 2010.
33. CAÍNZOS, M.; RODRÍGUEZ-SEGADE, F.; MARTINEZ-CASTRO, J.; PRIETO, D.; BECKER, M. R.; ANEIROS, F.; CORTES, J. Intra-abdominal adhesions after open and laparoscopic cholecystectomy: an experimental model. *Journal of Laparoendoscopy & Advanced Surgical*, v. 16, n. 2, p. 108-12, 2006.

REFERÊNCIAS

1. VON DEMBOWSKI, T. Über die Ursachen der peritonealen Adhäsionen nach chirurgischen Eingriffen mit Rücksicht auf die Frage des Ileus nach Laparotomien. *Langenbecks Archiv fuer Chirurgie*, v. 37, p. 745, 1889.
2. BROKELMAN, W. J. A.; LENSVELT, M.; BOREL RINKES, I. H. M.; KLINKENBIJL, J. H. G.; REIJNEN, M. M. P. J. Peritoneal changes due to laparoscopic surgery. *Surgical Endoscopy*, v. 25, p. 1-9, 2011.
3. ANDREASEN, P. A.; GEORG, B.; LUND, L. R.; RICCIO, A.; STACEY, S. N. Plasminogen activator inhibitors: hormonally regulated serpins. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v. 68, p. 1-19, 1990.
4. ELLIS, H. The aetiology of post-operative abdominal adhesions. An experimental study. *British Journal Surgery*, v. 50, p. 10-6, 1962.
5. ELLIS, H. The cause and prevention of postoperative intraperitoneal adhesions. *Surgery Gynecology Obstetrics*, v. 133, p. 497-511, 1971.
6. MYLLARNIEMI, H.; KARPPINEN, V. Vascular pattern of peritoneal adhesions. *British Journal Surgery*, v. 55, p. 605-8, 1968.
7. BIGATTI, G. et al. *Neoangiogenesis in adhesion formation and peritoneal healing*. In: TREUTNER, K. H.; SCHUMPELIK, V. (Org.). *Peritoneal adhesions*. Berlin: Springer-Verlag, 1997. p. 37-48.
8. LIAKAKOS, T.; THOMAKOS, N.; FINE, P. M.; DERVENIS, C.; YOUNG, R. L. Peritoneal adhesions: etiology, pathophysiology and clinical significance. *Digestive Surgery*, v. 18, p. 260-73, 2001.
9. ELLIS, H. The clinical significance of adhesions: focus on intestinal obstruction. *European Journal Surgery Supplements*, v. 577, p. 5-9, 1997.
10. ELLIS, H.; MORAN, B. J.; THOMPSON, J. N.; PARKER, M. C.; WILSON, M. S.; MENZIES, D. et al. Adhesion-related hospital readmissions after abdominal and pelvic surgery: a retrospective cohort study. *Lancet*, v. 353, p. 1476-80, 1999.
11. KÖSSI, J.; SALMINEN, P.; RANTALA, A.; LAATO, M. Population-based study of the surgical workload and economic impact of bowel obstruction caused by postoperative adhesions. *British Journal of Surgery*, v. 90, p. 1441-4, 2003.
12. RAY, N.; DENTON, W. G.; THAMER, M.; HENDERSON, S. C.; PERRY, S. Abdominal adhesiolysis: inpatient care and expenditures in United States in 1994. *Journal of the American College of Surgeons*, v. 186, p. 1-9, 1998.
13. IVARSSON, M. L.; HOLMDAHL, L.; FRANZEN, G.; RISBERG, B. Cost of bowel obstruction resulting from adhesions. *European Journal of Surgery*, v. 163, p. 679-84, 1997.

14. MENZIES, D.; ELLIS, H. Intestinal obstruction from adhesions: how big is the problem? *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, v. 72, p. 60–3, 1990.
15. MENZIES, D.; PARKER, K.; HOARE, R.; KNIGHT, A. Small bowel obstruction due to postoperative adhesions: treatment patterns and associated costs in 110 hospital admissions. *Annals of the Royal College of Surgeons of England*, v. 83, p. 40–6, 2001.
16. RAY, N. F.; DEANTON, W. G.; THAMER, M.; HENDERSON, S. C.; PERRY, S. Abdominal adhesiolysis: inpatient care and expenditures in the United States in 1994. *Journal of the American College of Surgeons*, v. 186, p. 1–9, 1998.
17. STOVALLI, T. G.; ELEDER, R. F.; LING, F. W. Predictors of pelvic adhesions. *Journal of Reproductive Medicine*, v. 34, p. 345–8, 1989.
18. DIZEREGA, G. S. Biochemical events in peritoneal tissue repair. *European Journal of Surgery Supplements*, v. 577, p. 10–16, 1997.
19. GUTT, C. N.; ONIU, T.; SCHEMMER, P.; MEHRABI, A.; BÜCHLER, M. W. Fewer adhesions induced by laparoscopic surgery? *Surgical Endoscopy*, v. 18, p. 898-906, 2004.
20. PAPPARELLA, A.; NOVIELLO, C.; ROMANO, M.; PARMEGGIANI, P.; PACIELLO, O.; PAPPARELLA, S. Local and systemic impact of pneumoperitoneum on prepuberal rats. *Pediatric Surgery International*, v. 23, p. 453–7, 2007.
21. MOLINAS, C. R.; MYNBAEV, O.; PAUWELS, A.; NOVAK, P.; KONINCKX, P. R. Peritoneal mesothelial hypoxia during pneumoperitoneum is a cofactor in adhesion formation in a laparoscopic mouse model. *Fertility and Sterility*, v. 76, p. 560–7, 2001.
22. MOLINAS, C. R.; KONINCKX, P. R. Hypoxaemia induced by CO₂ or helium pneumoperitoneum is a cofactor in adhesion formation in rabbits. *Human Reproduction*, v. 15, p. 1758–63, 2000.
23. INCE, A.; EROGLU, A.; TARHAN, O.; BÜLBÜL, M. Peritoneal fibrinolytic activity in peritonitis. *The American Journal of Surgery*, v. 183, p. 67-9, 2002.
24. VAN GOOR, H.; VAN DER MEER, J.; SLUITER, W.; BLEICHRODT, R. Coagulation and fibrinolytic responses of human peritoneal fluid and plasma to bacterial peritonitis. *British Journal of Surgery*, v. 83, n. 8, p. 1133-35, 1996.

ANEXOS

ANEXO A



Universidade
Estadual de Londrina

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 65/12

Londrina, 14 de março de 2012

A CEUA-UEL, reunido em 6 de março de 2012, avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Estudo experimental da formação de aderências peritoneal após laparoscopia em vigência de peritonite", registrado sob processo nº CEUA 67/10, pesquisa do Centro de Ciências da Saúde, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto está *aprovado* para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 40 machos da espécie *Rattus norvegicus*, divididos em 4 grupos de 10 animais. O estudo experimental é realizado em modelo de peritonite aguda, com os seguintes grupos: laparotomia controle e laparotomia peritonite, e estes por sua vez serão divididos em 2 subgrupos, denominadas laparotomia convencional e laparotomia com pneumoperitônio a 5 mmHg. O cronograma cirúrgico é composto por infecção das cruegas, 2 animais por dia, de segunda a sexta-feira, até que os 40 animais sejam operados. Para realização da cirurgia os animais serão anestesiados com solução de cloridrato de Ketamina 10% na dose de 60 mg/kg e solução de cloridrato de Xilazina 2% na dose de 10 mg/kg, por via intra-muscular. Doses subsequentes, com a metade da dose inicial de Ketamina serão realizadas para a manutenção da anestesia, assim que necessário. No sétimo dia pós-operatório será avaliado qualitativamente e quantitativamente a incidência de aderências na região investigada. O projeto está previsto para ser executado em 12 meses a partir da aprovação por esta comissão.

Cumprir orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL, anteriormente à execução das modificações.

Sem mais para o momento, subscrevo-me.

Cordialmente,

Waldiceu Ap. Ferriz Junior
Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Ferriz Junior
Coordenador da CEUA/UEL

Hmo. Sr.
Prof. Dr. Marco Aurélio de Freitas Rodrigues
Coordenador do Projeto
Departamento de Clínica Cirúrgica
Centro de Ciências da Saúde

Com cópia para Sr. Egl. Maria de Souza (Coord. da DCA/PROPPG) e Prof. Luiz Carlos Gilani (Diretor do Biotério Central da UEL)

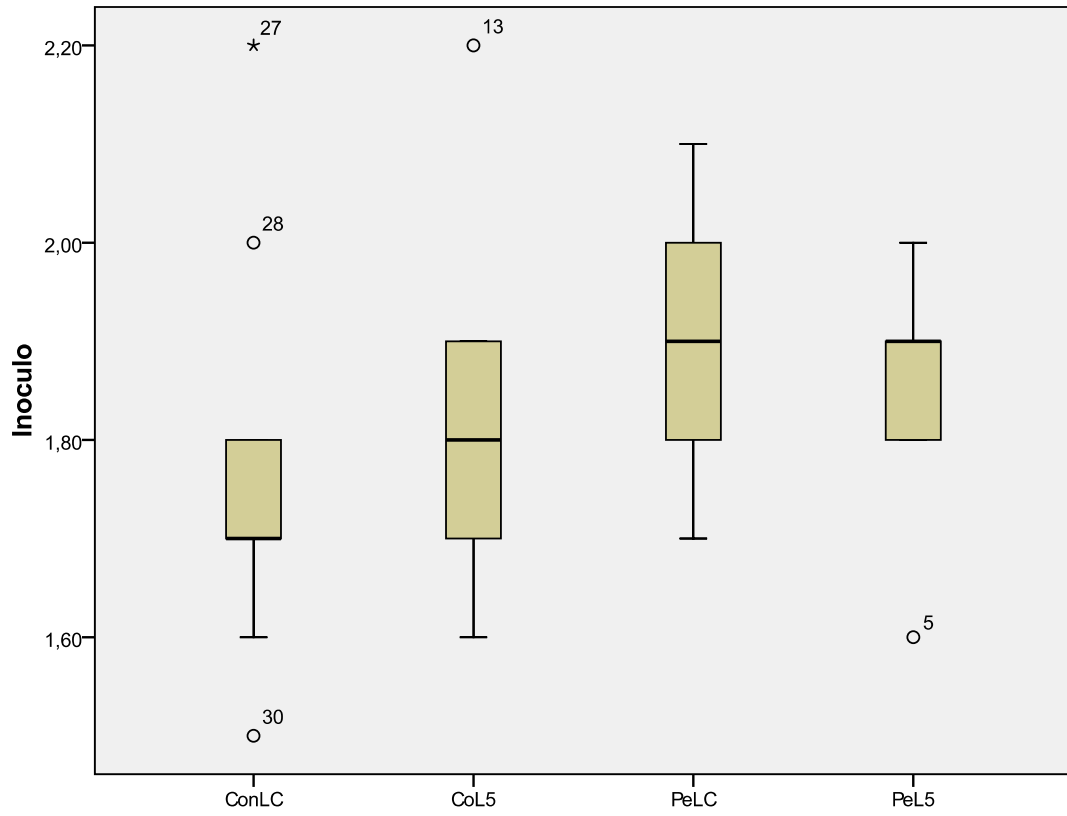
Tempo: Universidade Estadual de Londrina - CEP: 86.051-900 - Rua 24-A, 191 - Foz de Iguaçu - Paraná - Brasil - CEP: 81.531-980 - Londrina - Paraná - Brasil
Departamento de Clínica Cirúrgica - Centro de Ciências da Saúde

LONDRIANA PARANÁ BRASIL

ANEXO B

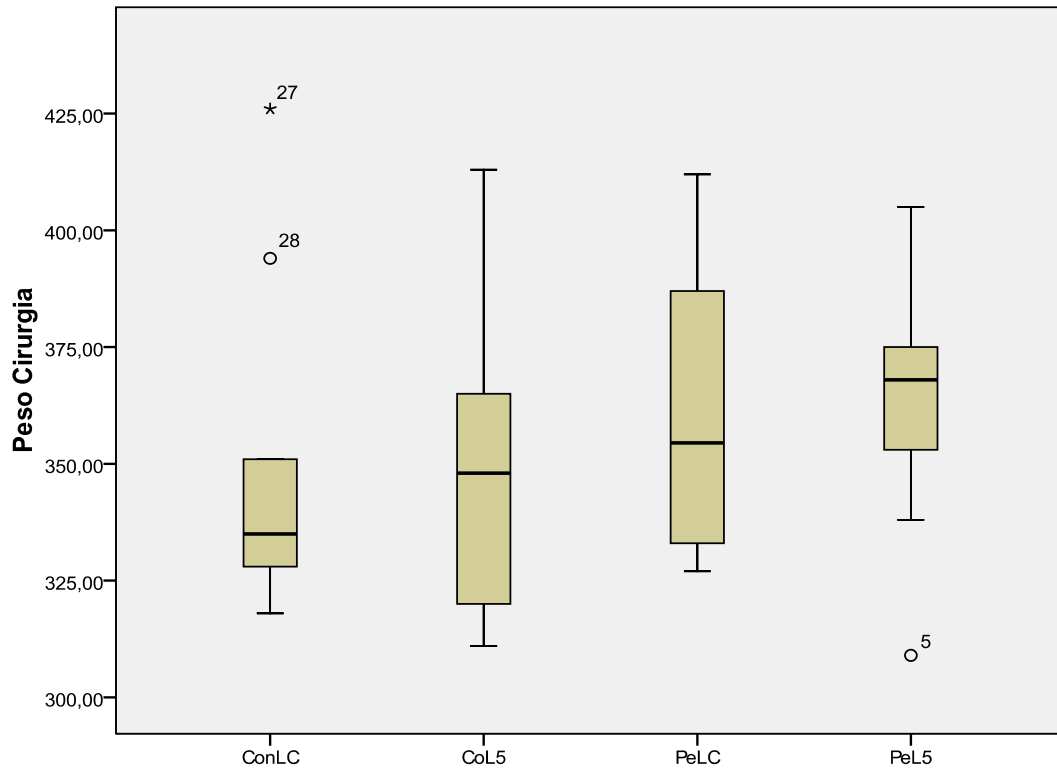
Escore total de adesão(Modified Diamond adhesion score)	
Características	Escore de adesão
Tenacidade	
Sem aderência	0
Adesão parcial	1
Solta com tração	2
Dissecção fina	3
Extensão(% da superfície do película de silicone coberta por pela adesão)	
0	0
<25	1
25-50	2
50-75	3
>75	4
Tipo	
Nenhuma	0
Fina(transparente)	1
Densa, sem vaso(translucente)	2
Densa, com vasos pequenos (< 50µm)	3
Densa, com vasos grandes (50-100µm)	4

ANEXO C

Gráfico 1 – Valores dos inóculos (ml) dos grupos CoLC, CoL5, PeLC e PeL5

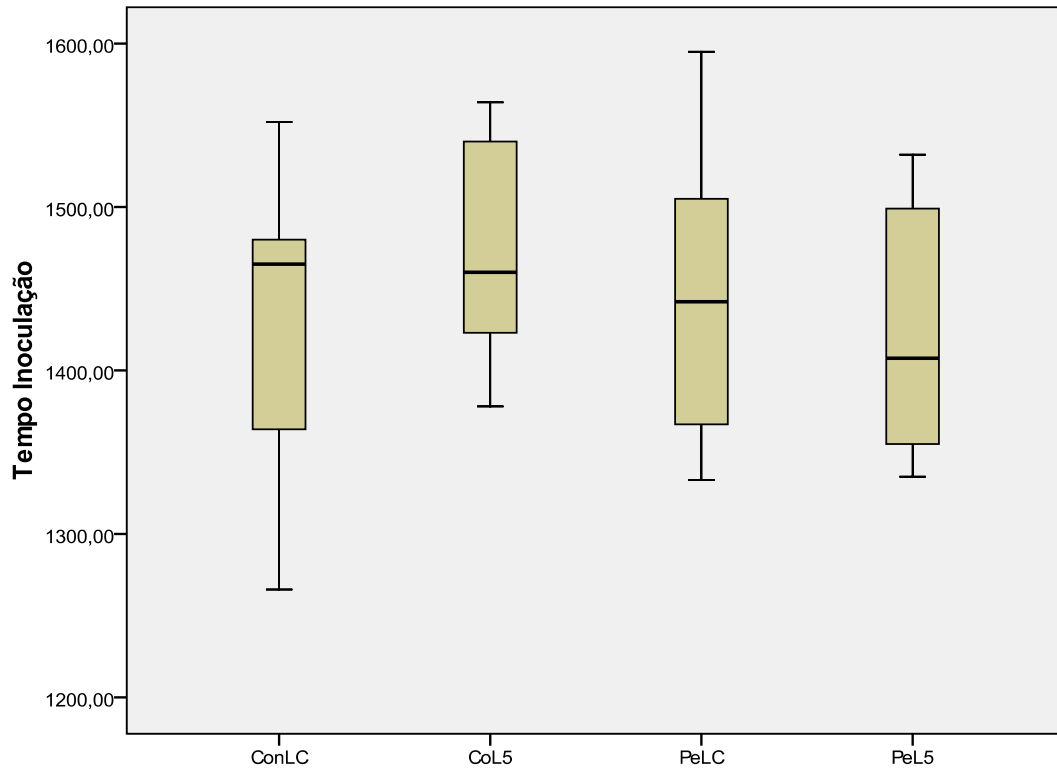
ANEXO D

Gráfico 2 – Valores dos pesos cirurgia (g) dos grupos CoLC, CoL5, PeLC e PeL5



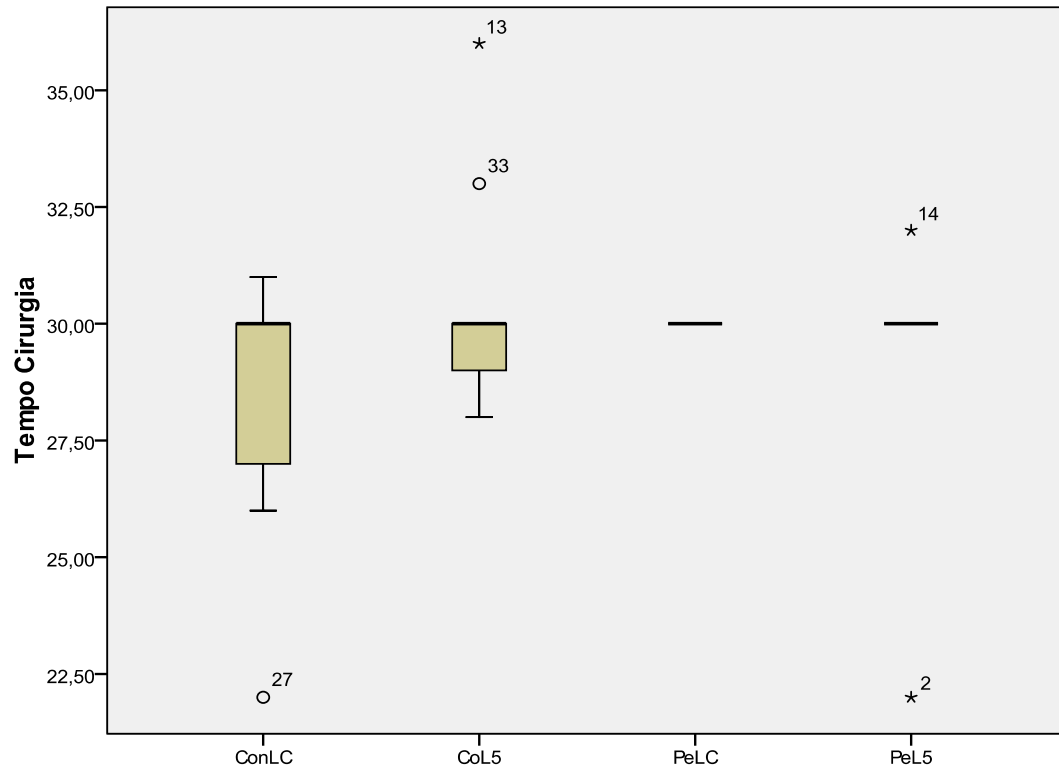
ANEXO E

Gráfico 3 – Valores dos tempos de inoculação (min) dos grupos CoLC, CoL5, PeLC e PeL5



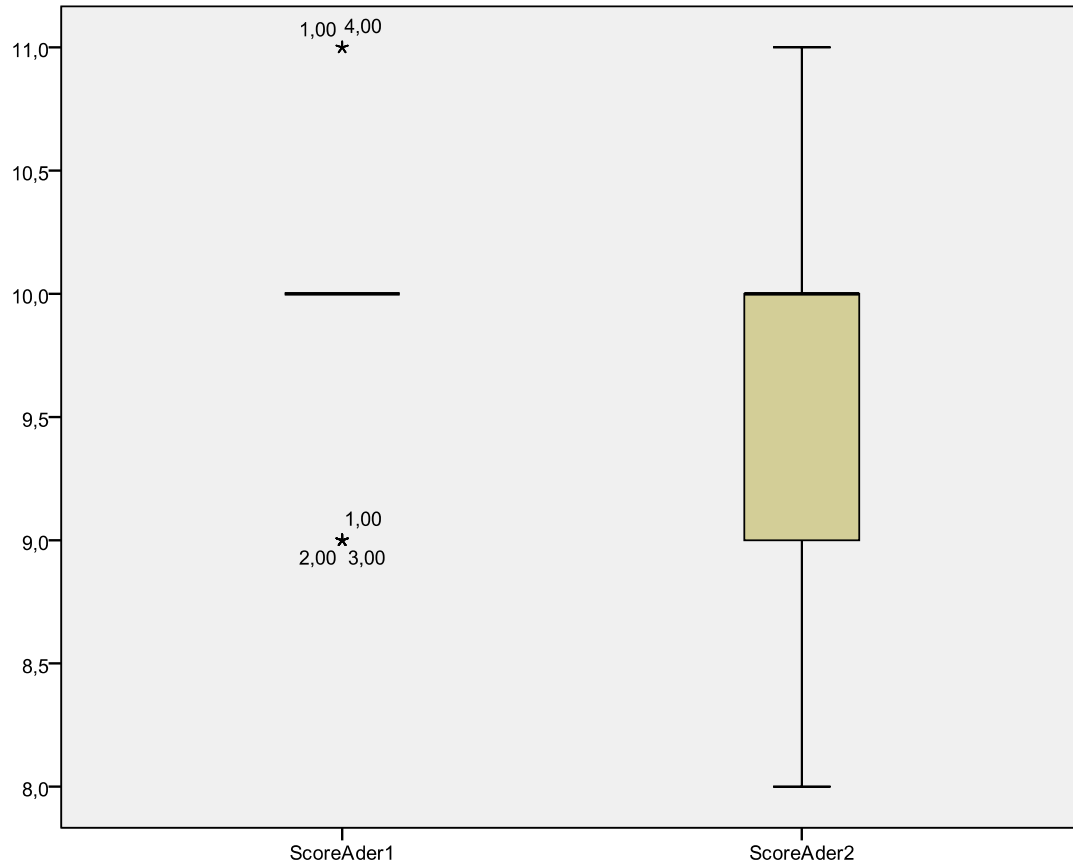
ANEXO F

Gráfico 4 – Valores dos tempos de cirurgia (min) dos grupos CoLC, CoL5, PeLC e PeL5



ANEXO G

Gráfico 5 – Valores dos escores de aderência dos grupos CoLC, CoL5, PeLC e PeL5



ANEXO H

Gráfico 6 – Valores MDV(%) dos grupos CoLC, CoL5, PeLC e PeL5