

JOÃO DANIEL MAY SERAFIM

**EFEITO DA CASTRAÇÃO PÓS-NATAL NA SEPSE
EXPERIMENTAL EM RATOS**

**Trabalho apresentado à Universidade Federal de
Santa Catarina, para a conclusão do Curso de
Graduação em Medicina**

Florianópolis

2002

JOÃO DANIEL MAY SERAFIM

**EFEITO DA CASTRAÇÃO PÓS-NATAL NA SEPSE
EXPERIMENTAL EM RATOS**

**Trabalho apresentado à Universidade Federal de
Santa Catarina, para a conclusão do Curso de
Graduação em Medicina**

Coordenador do Curso: Prof. Dr. Edson José Cardoso

Orientador: Prof. Dr. Armando José d'Acampora

Co-Orientador: Prof. Dr. Ricardo Tramonte

Florianópolis

2002

Serafim, João Daniel May

**Efeito da castração pós-natal na sepse de origem abdominal em ratos
Wistar / João Daniel May Serafim. – Florianópolis, 2002.**

33p.

Orientador: Armando José d'Acampora.

**Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Universidade Federal
de Santa Catarina – Curso de Graduação de Medicina.**

**1. Sepse 2. Ratos 3. Dimorfismo Sexual 4. Castração 5. Pulmão. I.
Título**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de iniciar agradecendo aos meus pais, WALDEMAR SERAFIM e MARIA DALVA MAY SERAFIM, pelo incentivo que sempre me deram, com suas críticas, sugestões, apoio, ora bem recebidos ora não, mas sabendo que cada um destes conselhos fizeram-me crescer um pouco mais, ou que em algum momento da minha vida irá me servir.

Aos meus irmãos, LUIZ ANDRÉ MAY SERAFIM e RAQUEL MAY SERAFIM, que apesar de termos algumas idéias divergentes, sempre me apoiaram durante a faculdade, e mesmo antes dela.

Aos professores ARMANDO JOSÉ d'ACAMPORA e RICARDO TRAMONTE, que além de professores, e orientadores neste trabalho entre outros, considero-os como amigos, pelos ensinamentos passados, por terem me ensinado o que é pesquisa, pelas piadas e momentos de descontração e pela amizade que levarei por toda a vida.

Aos professores JOÃO CARLOS XICOTA e JOEL ANTONIO BERNHARDT, e à professora TÂNIA SILVIA FRÖDER, agradeço a eles pela ajuda neste trabalho, desde o seu início e principalmente nas fases mais difíceis, por estarem sempre prestativos, e pela amizade que acabou se formando.

Aos funcionários do Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental, em especial ao amigo LUIZ HENRIQUE PRAZERES, que serve a todos como exemplo de profissional.

A todos os meus AMIGOS, sejam eles da faculdade ou não, serão sempre importantes, em todos os momentos da minha vida.

E para finalizar, um agradecimento em especial à minha namorada, MARIA LUIZA DA NOVA, pelo carinho, pelo amor, pelo apoio e solidariedade, por todos os momentos felizes, pela alegria, pelos sonhos e principalmente por fazer parte da minha vida.

A TODOS

OBRIGADO.

SUMÁRIO

RESUMO	v
SUMMARY	vi
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	4
3. MÉTODO	5
4. RESULTADOS	16
5. DISCUSSÃO	20
6. CONCLUSÕES	23
7. REFERÊNCIAS	24

NORMAS ADOTADAS

RESUMO

A sepse de origem bacteriana apresenta alta taxa de morbiletalidade. Na sepse o pulmão é o primeiro órgão a ser comprometido.

Na resposta a sepse, estudos experimentais, clínicos e epidemiológicos sugerem uma diferença sexual da resposta inflamatória sistêmica, sendo que o macho é menos resistente a infecções que as fêmeas.

O Objetivo deste trabalho é avaliar a castração pós-natal sobre a resposta pulmonar na sepse induzida em ratos.

Para isto foram utilizados 33 ratos Wistar distribuídos em 2 grupos:

CONTROLE (GC): 5 ratos machos, realizada a avaliação histológica do pulmão.

EXPERIMENTO (GE): 28 ratos submetidos a sepse por ligadura e perfuração de ceco (LPC) e distribuídos em 3 subgrupos conforme descrito abaixo:

MACHO (SgM): 9 ratos adultos submetidos a sepse por LPC.

FÊMEA (SgF): 9 ratas adultas submetidas a sepse por LPC.

CASTRADO (SgC): 10 ratos que no 4^a dia de vida foram submetidos a orquiectomia bilateral e quando adultos a sepse por LPC.

Após a LPC os animais foram observados até o óbito, quando se realizou a necropsia e retirada de fragmento do pulmão para análise histológica, observando o número de polimorfonucleares e mononucleares.

Observamos que 50% dos animais do SgC sobreviveram 24 horas, contra 33% do SgF e 0% do SgM.

O número de polimorfonucleares e mononucleares não foi diferente estatisticamente entre o SgC e CG, estando estatisticamente aumentados no SgM e SgF.

Assim concluímos que o SgC apresentou maior tendência a sobrevida, e que as alterações pulmonares observadas foram menores no SgC e maiores no SgM e SgF, mostrando uma resposta inflamatória menor no SgC.

SUMMARY

Introduction: Sepsis produced by bacterial infection shows a high degree of mortality. During a sepsis, the lung is the first organ affected by this kind of infection. Several experimental studies, clinical studies and epidemiological studies indicate a sexual difference in the inflammatory response between male and female subjects, in this case males normally are less resistant than females. The endocrine system normally has a strong influence in the immune system.

Objective: Evaluated the effects of post-natal castration in the pulmonary response during inducible sepsis in rats.

Method: To this study we use 33 rats (Wistar) separated in 2 groups:

CONTROL GROUP (GC) = 5 adult male rats, without any sepsis, in order to analyse the normal histology of the lungs.

EXPERIMENTAL GROUP (GE) = 28 rats submitted to sepsis by ligation and perforation of the cecum (LPC) divided in 3 sub-groups as follows:

MALES (SgM) 9 male rats submitted to sepsis by LPC.

FEMALES (SgF) 9 female rats submitted to sepsis by LPC.

CASTRATION (SgC) 10 male rats castrated in the 4^o day after birth, and submitted by sepsis in adult age using LPC.

After LPC, all animals were observed until death and submitted to necropsy. A fragment of the right lung in all animals was submitted to histologic and morphometric analysis to evaluate the number of polymorphonuclear cells and mononuclear cells.

Results: 50% of the rats in the SgC have a survival time of 24 hs, against 33% of the animals in the SgF and 0% in the SgM. The number of polymorphonuclear cells and mononuclear cells in the lung in SgC and CG, shows no statistical differences, but in animals of SgM and SgF groups, we found an increase of these cells with significant statistical differences.

Conclusions: Rats in the SgC show an increase of survival time after LPC. Alterations in lung observed were less intense in animals of the SgC and greater in animals of SgM. In animals of SgC was observed a decrease of inflammatory response.

1. INTRODUÇÃO

A sepse de origem bacteriana continua com alta taxa de morbidade e de mortalidade ¹.

A sepse pode ser o evento final de um paciente em estado avançado de doença grave, como também é causa comum e potencialmente prevenível de morte em pacientes com doenças menos severas ².

A literatura mostra taxa de mortalidade nos pacientes vítimas de sepse abdominal oscilando entre 20 a 80% ³⁻⁷. A explicação para a ampla faixa de variação entre os índices de mortalidade nos trabalhos, reflete a diferença de padronização nos parâmetros de observação da sepse ¹.

A partir de 1992, uma tentativa de padronização da sepse proposta por BONE ⁸, a sepse passou a ser definida como uma resposta sistêmica à infecção, manifestando-se no homem adulto por dois ou mais dos seguintes sinais:

- (1) temperatura maior que 38° C ou menor que 36° C,
- (2) frequência cardíaca maior que 90 batimentos por minuto,
- (3) frequência respiratória maior que 20 respirações por minuto ou pressão parcial de CO₂ (PaCO₂) menor que 32 mmHg, e
- (4) alterações na contagem leucocitária (maior que 12.000 células/mm³ ou menor que 4.000 mm³, ou mais que 10% nas formas imaturas). Quando severa está associado a disfunção orgânica, hipoperfusão ou hipotensão ^{2, 9, 10, 11}.

Tudo indica, que os eventos que decorrem da sepse e do choque séptico são causados por endotoxinas produzidas por bacilos Gram negativos, com ação direta sobre as células, causando lesão ou alterando suas funções, ou ainda por ação indireta, aparentemente, mais importante, deflagrando a síntese, liberação ou ativação da cascata de mediadores derivados das células do hospedeiro ^{10, 12, 13, 14}.

Dentre os mediadores moleculares mais importantes ativados pelas endotoxinas através da estimulação direta do sistema fagocítico mononuclear estão a interleucina 1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF) ^{10, 12, 13, 14}.

Estas citocinas, liberadas principalmente pelos macrófagos, são responsáveis, no endotélio, pelo efeito de aumentar a aderência leucocitária, aumentando a síntese de

prostaciclina, a atividade pró-coagulante e a liberação de citocinas secundárias com poder quimiotático além da estimulação medular, como as interleucinas 1, 6 e 8, e o fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF) ^{10, 12, 13, 14}.

Quando o processo inflamatório é muito intenso, há lesão endotelial com aumento da permeabilidade capilar e conseqüente edema, que leva a oclusão capilar e isquemia ^{10, 14, 15, 16, 17}, sugerindo que a maior ameaça à sobrevivência após a sepse não decorre da infecção propriamente dita, mas sim da progressiva disfunção dos órgãos, como conseqüência de uma resposta inflamatória sistêmica ¹⁸.

Aparentemente o pulmão é o primeiro órgão a ser atingido ¹. No pulmão a Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA) é reconhecida como uma das disfunções orgânicas, sendo uma manifestação pulmonar causada pelo processo inflamatório sistêmico não controlado, manifestada por uma resposta inflamatória intensa do parênquima pulmonar a um estímulo infeccioso ou não, que pode ser local ou sistêmico. Está associada a sepse em 18 a 38% dos casos, sendo mais comum em pacientes que desenvolvem sepse por bactérias Gram-negativas. Apesar de todos os avanços na terapêutica da SARA, a taxa de mortalidade é muito alta, usualmente maior que 50% ¹⁰.

O diagnóstico de SARA é dado quando há um início agudo, índice de dano pulmonar ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) ≤ 200 mmHg, infiltrado pulmonar bilateral ao Raio-X de tórax e pressão da artéria pulmonar ≤ 18 mmHg quando mensurada ou sem evidência clínica de hipertensão arterial esquerda ^{9, 10}.

Estudo experimental em ratos Wistar, mostrou hemorragia parenquimal e destruição do epitélio brônquico em animais submetidos a sepse, sendo a hemorragia parenquimal relacionada com o óbito do animal ¹⁷. Também observou-se que os polimorfonucleares estão presentes em elevado número no pulmão de ratos onde induziu-se a sepse, sendo que estas são as principais células na resposta aguda ¹⁹.

Na resposta a sepse estudos experimentais, clínicos e epidemiológicos sugerem uma diferença sexual na suscetibilidade da resposta inflamatória sistêmica ^{1, 20 e 21}.

OBERHOLZER ²⁰, mostrou que as mulheres possuem um risco menor de desenvolver sepse e disfunção de múltiplos órgãos e sistemas comparados aos homens, quando submetidos a uma lesão grave.

SCHRÖDER ²¹ em 1998, confirmou que existe diferença sexual na sepse humana, sendo que as mulheres possuem um melhor prognóstico, e que este fato deve estar relacionado com o aumento dos níveis de mediadores anti-inflamatórios nas mulheres.

Em recente estudo sobre sepse experimental em ratos Wistar, d'ACAMPORA ¹ (1996) observou que as fêmeas são mais resistentes à infecção que os machos, evoluindo com menos frequência para o óbito.

A literatura mostra que o eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal sofre influência de núcleos hipotalâmicos sexualmente diferenciados, sendo capazes de alterar a resposta imune induzida experimentalmente ^{22, 23}.

O sistema imune também sofre influências diretas do sistema endócrino. A orquiectomia, principalmente em animais jovens, não permite a involução do timo e podendo sofrer até mesmo hiperplasia. Estudos recentes sugerem que as células T e B são alvos da ação direta dos hormônios sexuais ²⁴.

HANDA ²⁵, em trabalho de revisão (1994), relata que a castração de ratos machos no período pré-juvenil ou quanto adulto aumenta o nível de corticosteróide após estresse, e que a reposição de testosterona retorna a resposta do corticosteróide ao estresse como o animal normal.

A testosterona possui atuação nas células T e interferem no sinal necessário para a célula B produzir anticorpos, assim diminuindo a sua produção. Já o estrogênio tem a capacidade de aumentar a capacidade dos macrófagos e monócitos de fagocitarem antígenos ²⁴.

O efeito dos hormônios esteróides na resposta imune, tornou-se objeto de muitos trabalhos nos dias atuais.

É descrito na literatura que ratos machos castrados aumentam os níveis de IgM e IgG na resposta imune quando comparados aos não castrados, e que níveis de IgM estão relacionados com o número de cromossomos X existentes ^{24, 26, 27}. Os níveis de IgM, IgG e IgA são maior nas fêmeas que nos machos ²⁶.

Na literatura não conseguimos achar uma resposta convincente do fato de os machos serem menos resistentes a infecção que as fêmeas, por isto foi montado um experimento que pudesse reproduzir o fato e quem sabe esclarecer mais uma faceta desta cascata.

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito da castração pós-natal sobre a resposta pulmonar na sepse induzida em ratos Wistar.

3. MÉTODO

3.1. AMOSTRA

O experimento foi realizado no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental do Departamento de Clínica Cirúrgica da Universidade Federal de Santa Catarina.

Foram utilizados 33 (trinta e três) ratos adultos, machos, com idade de 180 dias, da espécie *Rattus norvegicus* da linhagem Wistar, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina.

Os animais receberam alimentação própria para a espécie, com acesso livre a dieta e água durante todo o período do experimento, sendo mantidos sob luz natural, mantendo o ciclo dia/noite, em gaiolas de plástico comportando 3 animais por gaiola. A temperatura média era de 25 graus centígrados (°C), mantida com a ajuda de um condicionador de ar, em condições ambientais de ruído, temperatura e umidade, consideradas como normais para o meio.

Os animais foram distribuídos em 2 grupos:

1. **GRUPO CONTROLE – GC (n=5):** 5 (cinco) animais do sexo masculino, que foram submetidos a eutanásia para a obtenção do lobo inferior do pulmão direito para avaliação morfométrica do pulmão normal.
2. **GRUPO EXPERIMENTO – GE (n=28):** Os animais deste grupo foram distribuídos em 3 subgrupos conforme descrito a seguir:

2.1. SUBGRUPO MACHO – SgM (n=9): 9 (nove) animais do sexo masculino que foram submetidos a sepse de origem fecal, e após tiveram um acompanhamento clínico constante, sendo que os 5 (cinco) primeiros animais que evoluíram para o óbito foram submetidos à necropsia e a retirada do lobo inferior do pulmão direito para análise morfométrica.

2.2. SUBGRUPO FÊMEA – SgF (n=9): 9 (nove) animais do sexo feminino que foram submetidas a sepse de origem fecal, e após tiveram um acompanhamento clínico constante, sendo que os 5 (cinco) primeiros animais que evoluíram para o óbito foram submetidos à necropsia e a retirada do lobo inferior do pulmão direito para análise morfométrica.

2.3. SUBGRUPO CASTRADO – SgC (n=10): 10 (dez) animais do sexo masculino que no 4^o (quarto) dia de vida foram submetidos à orquiectomia bilateral e, quando considerados adultos, foi realizado a sepse de origem fecal, e após tiveram um acompanhamento clínico constante, sendo que os 5 (cinco) primeiros animais que evoluíram para o óbito foram submetidos à necropsia e a retirada do lobo inferior do pulmão direito para análise morfométrica.

3.2. PROCEDIMENTOS

ANESTÉSICO

Os animais do **SgC**, quando apresentavam 4 dias de vida, foram submetidos a anestesia geral através da inalação de éter etílico em uma campânula contendo folhas de gazes embebidas em éter etílico, até que os mesmos não apresentassem mais sinais de locomoção, constatado através do pinçamento leve da pata traseira direita dos animais, a fim de se certificar da profundidade da anestesia, sendo considerado o animal anestesiado, todos aqueles que não apresentaram reflexo de retirada da pata ao pinçamento.

Quando os animais do grupo experimento eram considerados adultos (peso entre 180 e 240g), foram submetidos a anestesia geral com uma solução de Cloridrato de Cetamina (5 mililitros) e solução aquosa a 2 % de Cloridrato de 2 - (2, 6-xilidino)- 5, 6 – dihidro – 4 – H - 1,3 – tiazina (1 mililitro) sendo injetado 0,1 ml da solução para cada 100 g de peso do animal, pela via intramuscular, na face interna da pata traseira direita. O animal foi considerado anestesiado, quando havia perdido o reflexo córneo-palpebral e não exibia qualquer reação motora pela preensão do coxim adiposo de sua pata dianteira.

CASTRAÇÃO

Os animais do SgC, após serem anestesiados como descrito anteriormente, foram posicionados, em decúbito dorsal, sobre a base do microscópio cirúrgico com fixação através de uma fita adesiva nas patas.

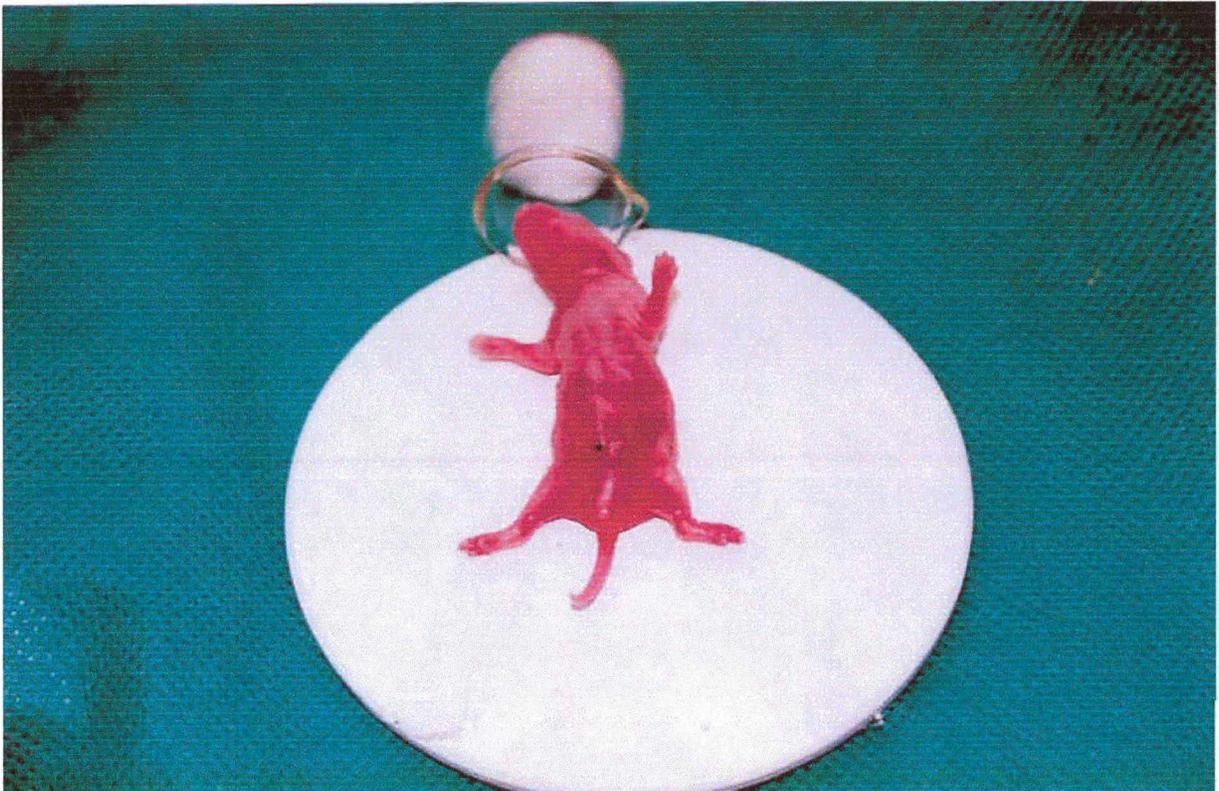


Figura 1 - Fotografia mostrando o animal com 4 dias de vida, sob anestesia inalatória com éter etílico, fixado com auxílio de fita adesiva sob a base do microscópio cirúrgico.

Após a anti-sepsia da parede ventral do abdome com iodo-povidona, foram realizadas duas incisões para-medianas de 0,5 centímetros, situadas abaixo da cicatriz umbilical através das quais foram exteriorizadas as gônadas. Reconhecidas as gônadas foi realizada a ligadura da artéria testicular juntamente com o ducto deferente com fio de poligalactina 6-0. Após a exteriorização e ligadura, foi realizada a secção dos testículos juntamente com o epidídimo de cada um dos lados do animal.



Figura 2 - Fotografia mostrando a incisão abdominal e a exteriorização do testículo.

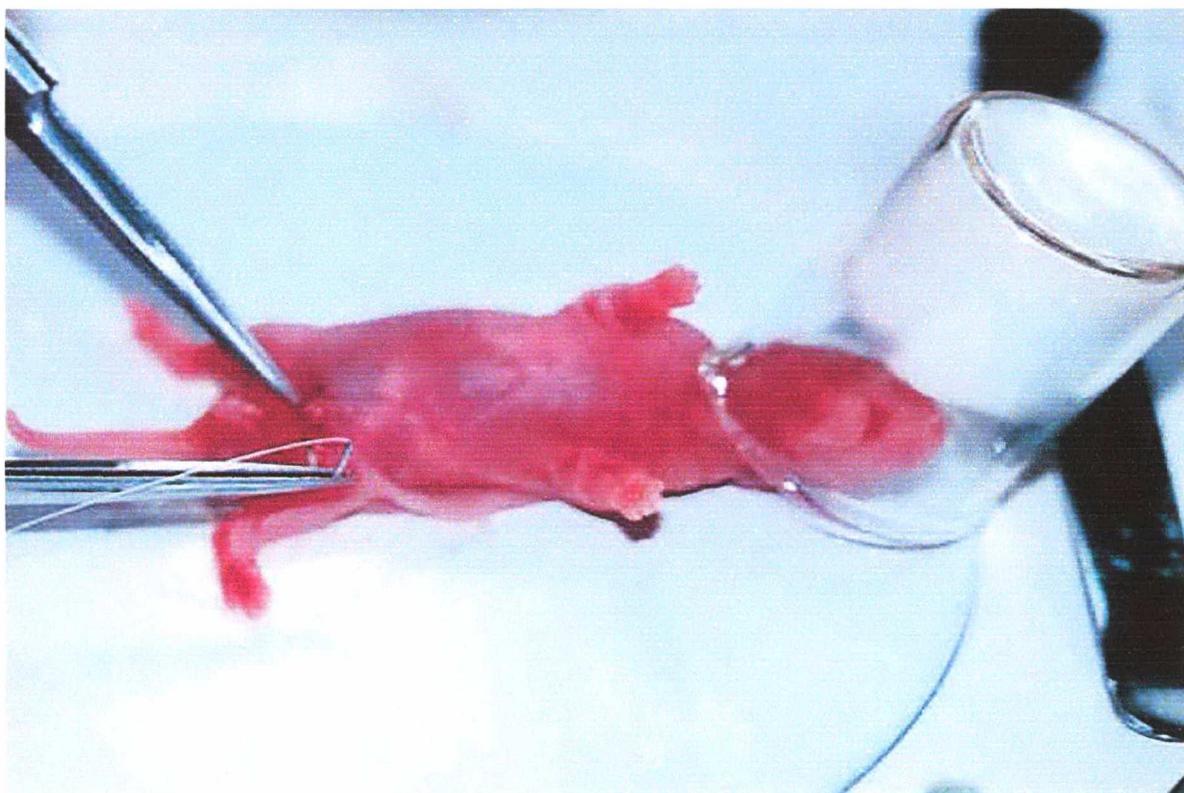


Figura 3 - Fotografia mostrando o fechamento da parede abdominal com fio de poligalactina 6-0.

Após, a parede abdominal e a pele foram suturadas com pontos totais com fio de poligalactina 6-0.

Após a cirurgia os animais foram mantidos aquecidos com auxílio de um foco de luz de 60 Watts a 25 centímetros de distância, e assim que os animais manifestassem movimentos de locomoção, foram considerados recuperados da anestesia, sendo devolvidos para a gaiola com a sua respectiva genitora, aonde permaneceram até atingir a puberdade.

Completada a puberdade (21 dias de vida), os animais foram separados da sua genitora.

INDUÇÃO DA SEPSE EXPERIMENTAL

Após serem anestesiados, os animais do grupo experimento foram imobilizados e colocados em uma prancha de madeira de 30 cm x 35 cm e fixados pelas suas patas através de fita adesiva, na posição de decúbito dorsal horizontal.

Após a epilação e anti-sepsia com solução de iodo-povidona em toda a parede anterior e lateral do abdome do animal, foi realizada uma laparotomia mediana de aproximadamente 3 cm.

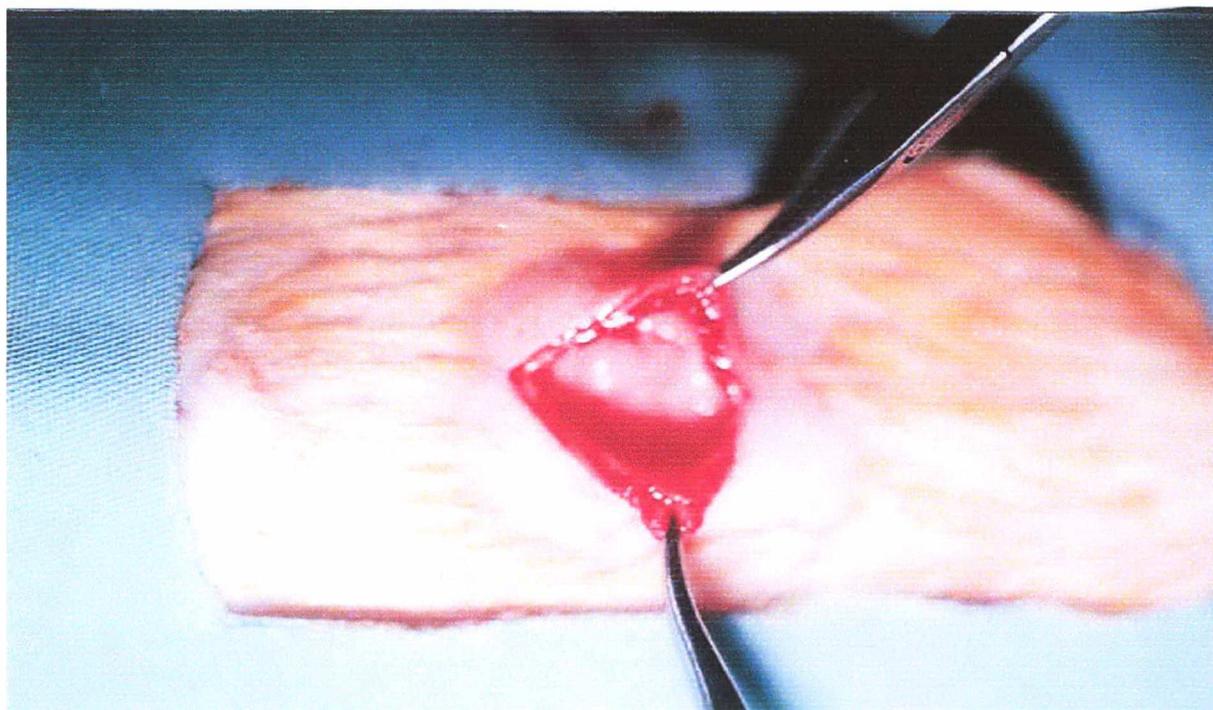


Figura 4 – Fotografia mostrando a laparotomia mediana realizada nos animais do grupo experimento

Realizado o inventário da cavidade peritoneal, sendo reconhecido e exposto o ceco, procedeu-se a ligadura do colo ascendente na sua porção mais proximal ao ceco com fio de algodão 3-0 e após realizado uma incisão de 5 mm em uma porção avascularizada do ceco, quando era marcado o dia e o horário desta perfuração na folha de protocolo. Após este procedimento, o mesmo era devolvido a cavidade abdominal.

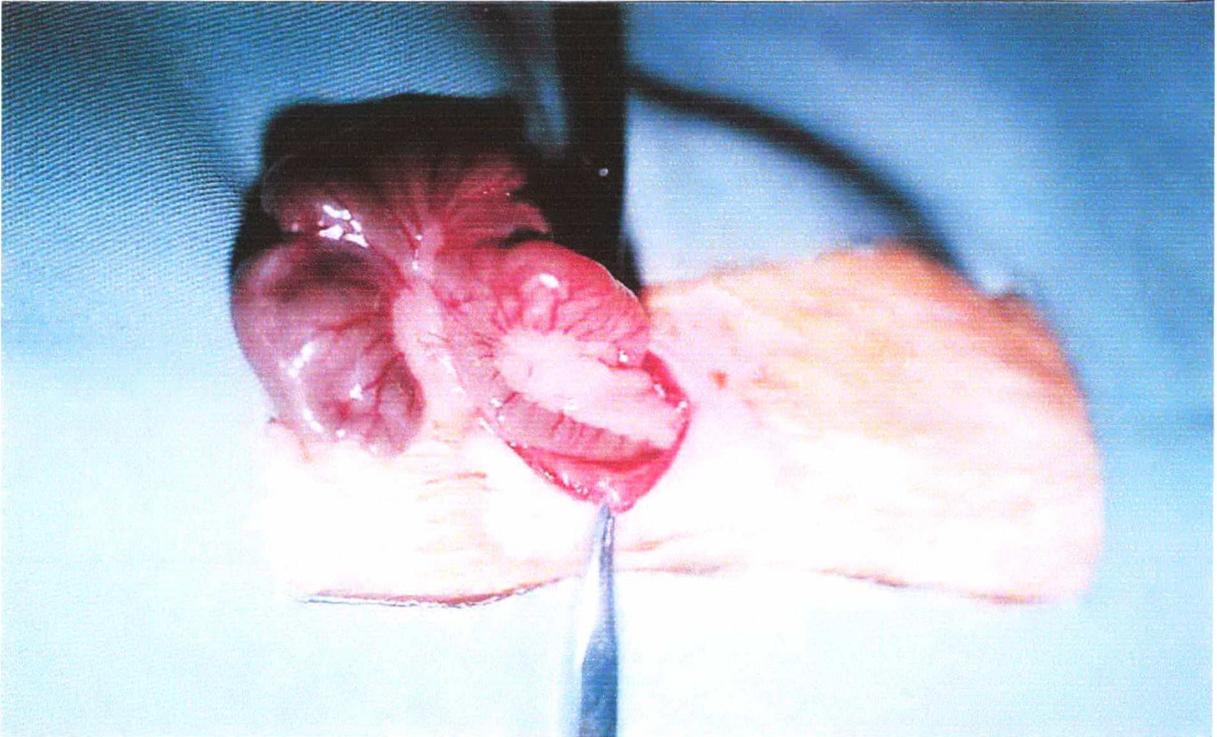


Figura 5 – Fotografia mostrando a exposição do ceco.

A síntese da cavidade abdominal foi realizada por planos, sendo suturados os planos peritoneal e muscular com fio de polipropileno 5-0, em chuleio interrompido a cada quatro pontos. A pele foi suturada com fio de nylon 5-0 em pontos simples separados.

Os animais foram acompanhados em sua evolução clínica até o óbito.

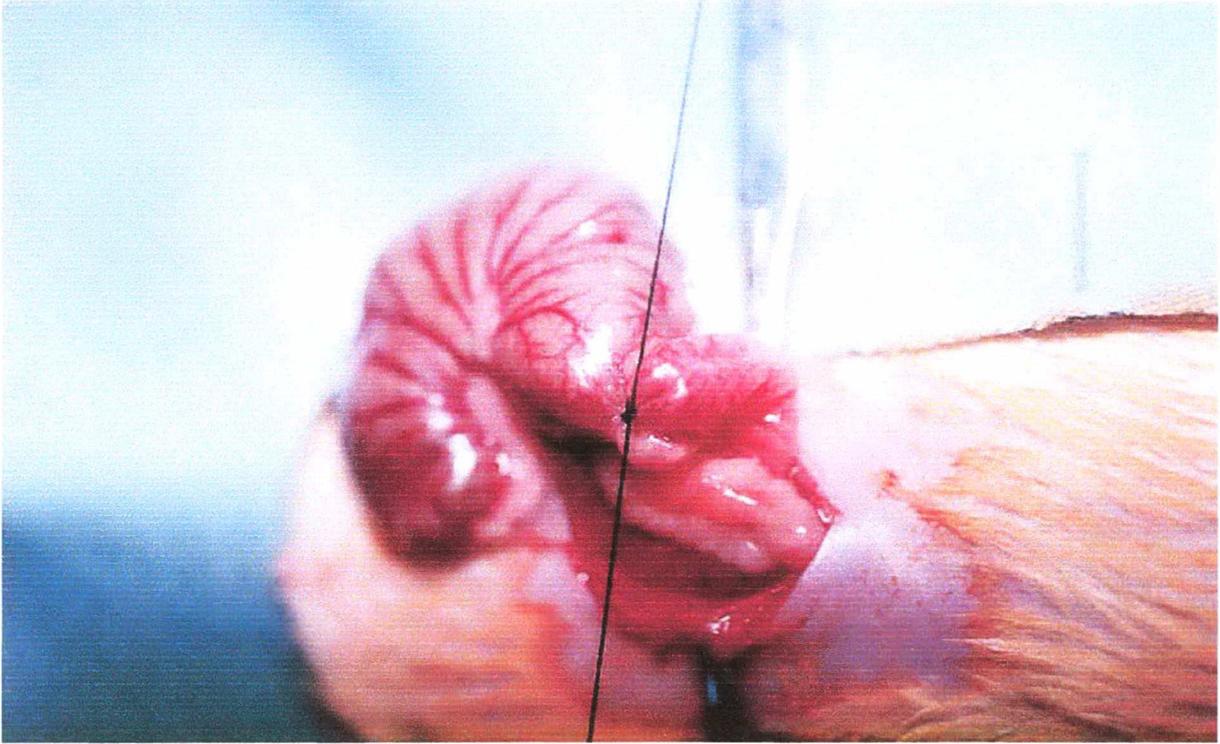


Figura 6 - Fotografia mostrando a ligadura com algodão 3-0 na porção proximal da alça ascendente do colo.

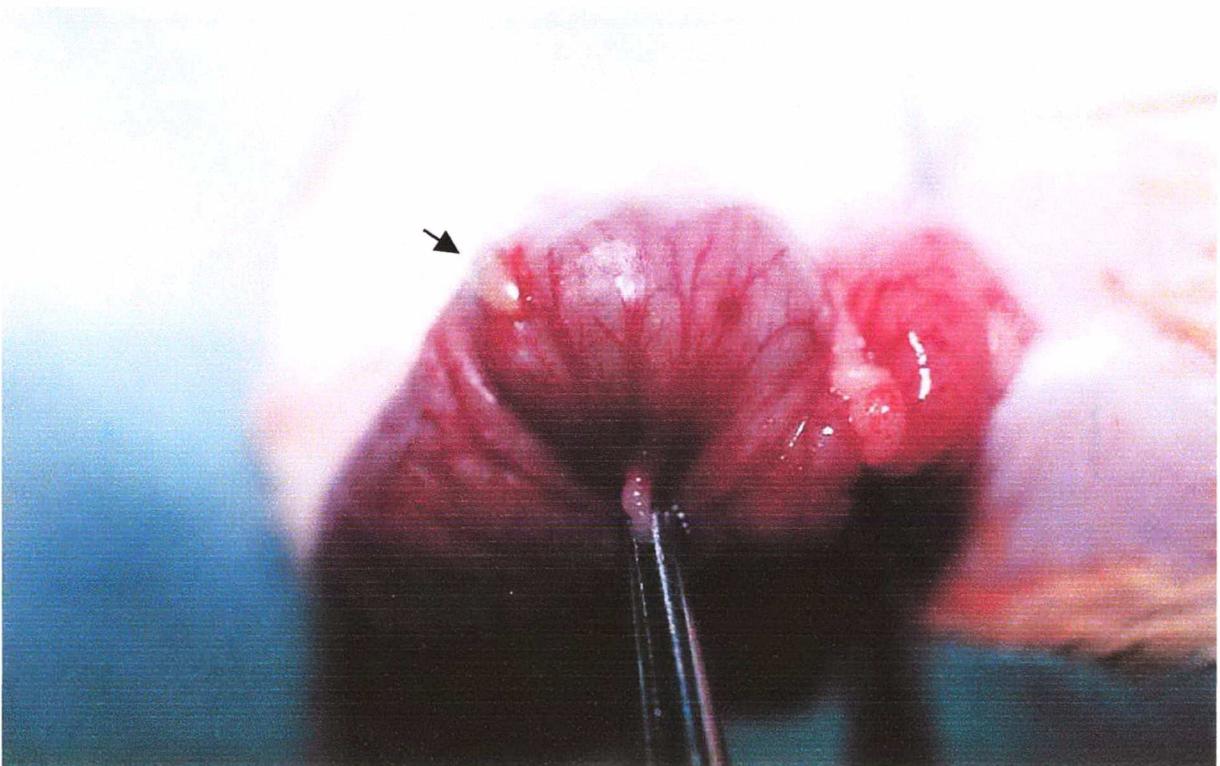


Figura 7 – Fotografia mostrando a perfuração do ceco (indicada pela seta).

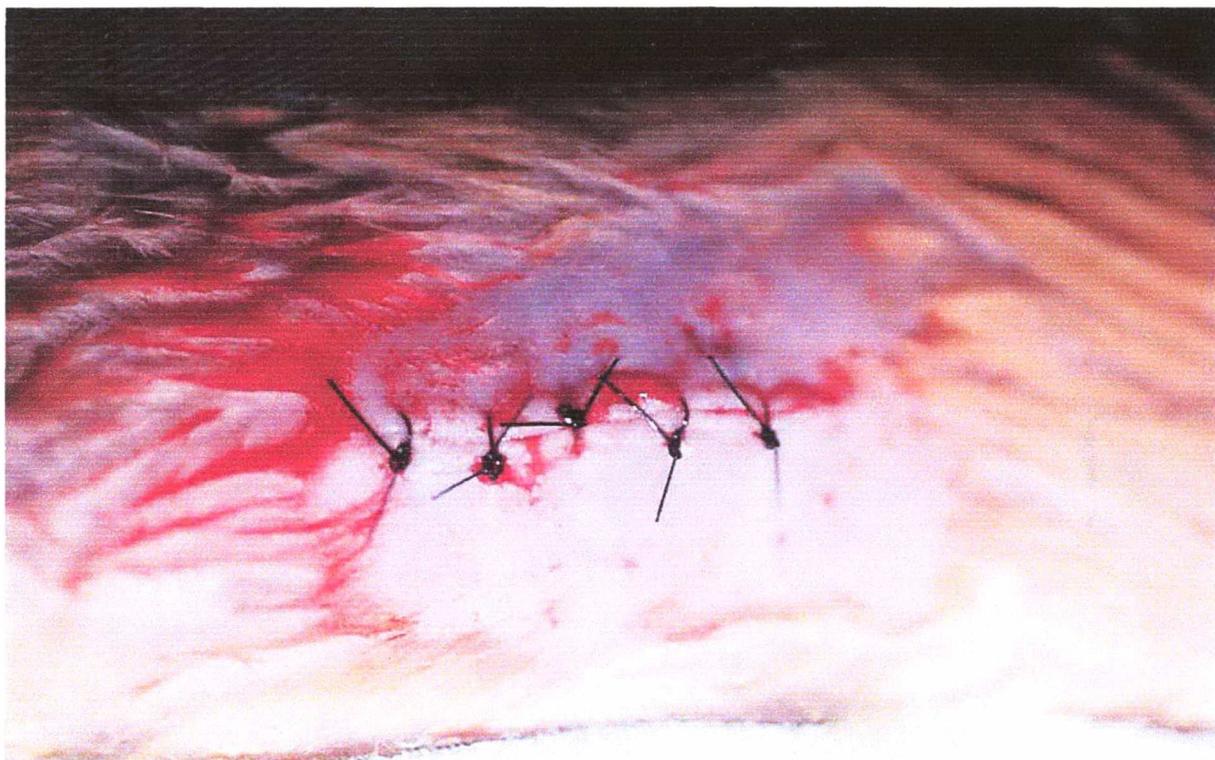


Figura 8 - Fotografia mostrando a sutura da pele com pontos separados com fio de nylon 5-0.

AVALIAÇÃO CLÍNICA

Os animais após o procedimento cirúrgico, foram colocados isolados em gaiolas, com acesso livre a água e alimentação própria para a espécie, sendo os mesmos acompanhados clinicamente durante 24 horas, e no momento que ocorria o óbito do animal, o dia e o horário eram anotados na folha de protocolo e os animais que não evoluíram até o óbito nas primeiras 24 horas após a perfuração e ligadura do ceco foram submetidos a eutanásia com o uso de altas doses de éter etílico inalatório.

Foi então observado o tempo de sobrevivência, em minutos, destes animais, deste o momento da perfuração do ceco até o momento de seu óbito.

NECRÓPSIA

Nos cinco primeiros animais, de cada subgrupo do grupo experimento, que evoluíram para o óbito, e nos cinco animais do **GC**, foi realizada uma incisão tóraco-abdominal e realizada o inventário das cavidades torácica e abdominal.

Para avaliação histológica, foi retirado unicamente o lobo inferior do pulmão direito, sendo este fragmento escolhido por sorteio.

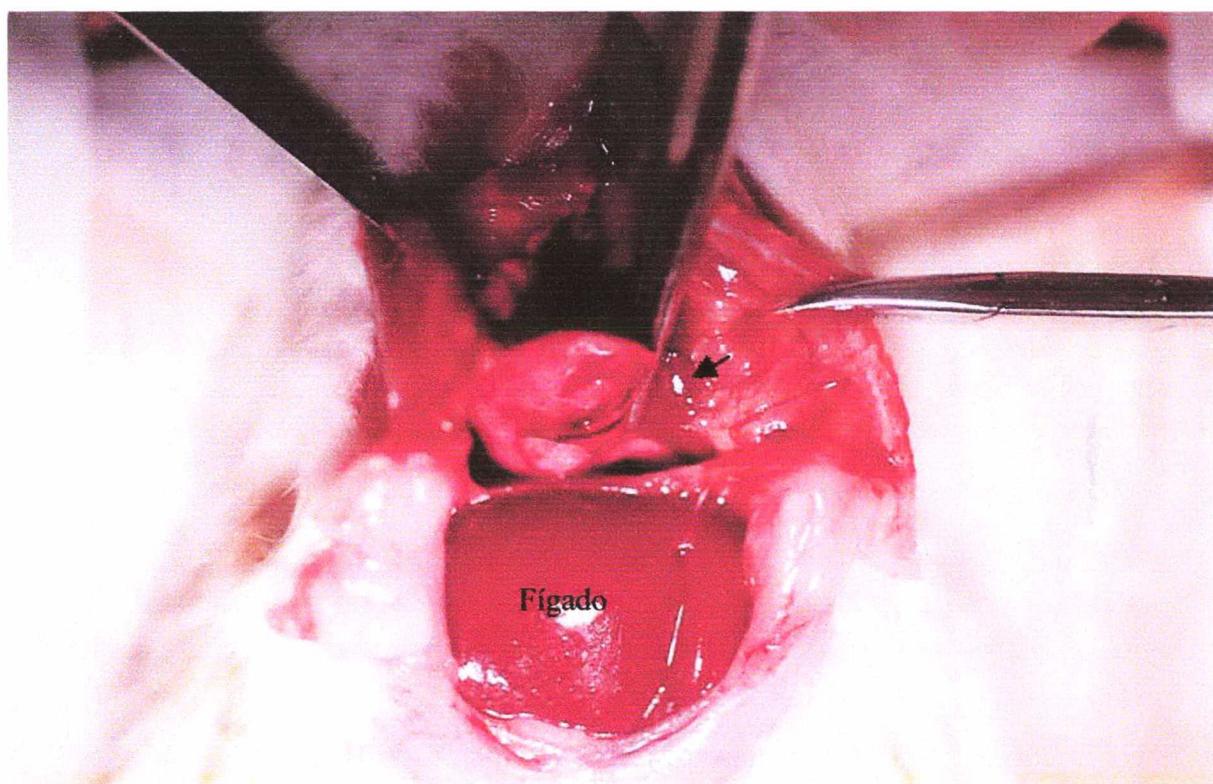


Figura 9 – Fotografia mostrando a incisão toraco-abdominal e a retirada do lobo inferior do pulmão direito (indicado pela seta).

AValiação Histológica

Após a necropsia, o lobo inferior do pulmão direito dos animais era imediatamente fixado em Formol a 10% tamponado com PBS 0,4M com pH de 7,4, e enviados ao

Laboratório de Histologia do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

As peças foram submetidas ao processo de inclusão em parafina com a face diafragmática do lobo inferior do pulmão direito voltado para o plano de corte, após foram seccionadas em micrótomo para obtenção de 6 cortes histológicos semi-seriados de 10 micrômetros (μm) de cada peça.

As lâminas, assim obtidas, foram coradas pelo método da Hematoxilina-Eosina.

Posteriormente as lâminas do pulmão, já devidamente coradas, foram submetidas à análise morfométrica, com auxílio de uma grade de contagem, sob um aumento de 400x, no qual se identificava bronquíolo propriamente dito, seccionado transversalmente na lâmina, sendo que a parede lateral do bronquíolo foi posicionada na lateral esquerda do campo visual, posicionando-se a grade de contagem (que foi colocada na ocular do microscópio) tangenciando a parede bronquiolar, usando como referência a última camada de células musculares lisas do bronquíolo propriamente dito. Delimitou-se, então, uma área com a grade, medindo $100 \mu\text{m}^2$, na porção lateral do bronquíolo. Dentro desta área foi contado o número de polimorfonucleares e monomorfonucleares.

Para a realização desta contagem, a grade foi previamente calibrada, empregando-se uma lâmina objeto, a fim de verificar o tamanho exato em micrômetros de cada quadrado presente na grade de contagem. Para tanto, utilizou-se a técnica preconizada por MANDARIM-DELACERDA (1995) ²⁸.

A análise de todas as lâminas foi realizada pelo mesmo pesquisador, tentando assim evitar, ao máximo, variações no seu resultado.

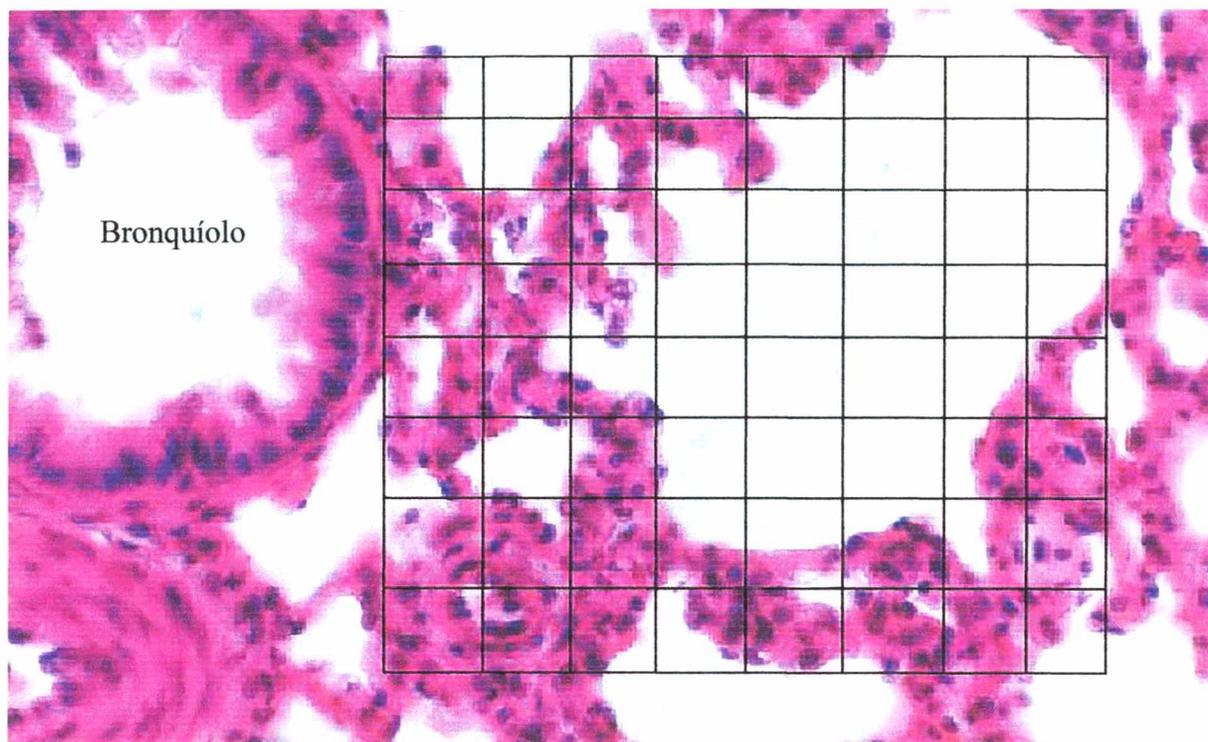


Figura 10 – Fotomicrografia com aumento de 400x, ilustrando como foi realizada a contagem celular com ajuda da grade ocular.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram reunidos em planilhas e submetidos à análise estatística.

A comparação do tempo de sobrevivência dos animais foi feita utilizando-se a curva de sobrevivência de KAPLAN-MEIER.

Já a comparação dos achados morfométricos, isto é, a contagem de células inflamatórias nos diferentes grupos foi feita utilizando-se o teste estatístico ANOVA modificado por NEWMAN-KEULS.

Os dados eram considerados estatisticamente significantes para um $p \leq 0,05$, sendo anotado com asterisco os valores onde **p** foi significativo.

4. RESULTADOS

Dos 28 animais do grupo experimento, 20 evoluíram para o óbito em até 24 horas após a indução da sepse, sendo que os 8 animais que sobreviveram até 24 horas após a indução da sepse, foram submetidos a eutanásia. A curva de sobrevida de KAPLAN-MEIER dos animais do grupo experimento encontra-se a seguir.

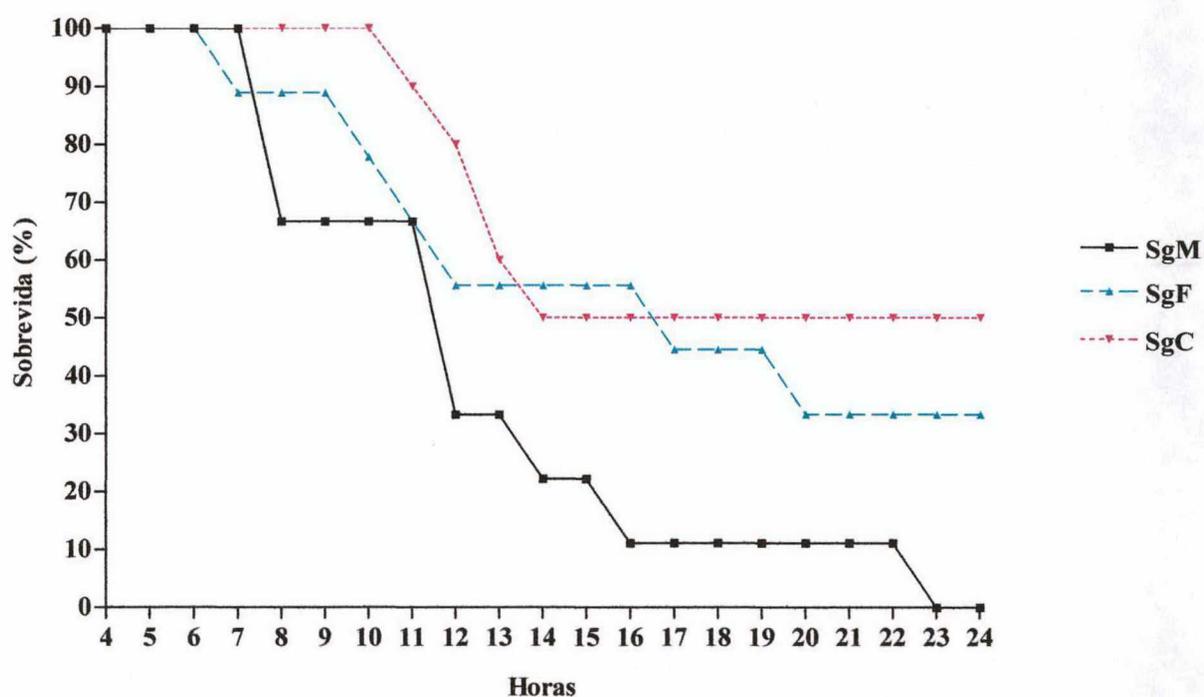


Figura 11: Curva de KAPLAN-MEIER de sobrevida em 24 dos animais estudados conforme o seu subgrupo.

A seguir podemos ver a porcentagem de animais que sobreviveram as 24 horas de observação após a sepse conforme descrito na metodologia.

TABELA I: EFEITO DA CASTRAÇÃO PÓS-NATAL NA SEPSE EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR. ANIMAIS QUE SOBREVIVERAM 24 HORAS APÓS A INDUÇÃO DA SEPSE.

SUBGRUPOS	N.º DE ANIMAIS	% DE ANIMAIS
SgM	0/9	0 %
SgF	3/9	33,3%
SgC	5/10	50%
TOTAL	8/28	28,5%

No **SgM**, todos os animais evoluíram para óbito nas 24 horas após a indução da sepse, no **SgF** 3 animais sobreviveram até a 24^a hora perfazendo um total de 33,3% dos animais deste subgrupo. Já no **SgC** 50% dos animais sobreviveram as primeiras 24 horas.

Observamos que houve uma grande diferença no percentual de sobrevida no final das 24 horas entre o **SgC** e o **SgM** e entre o **SgF** e o **SgM**, e que esta diferença não foi tão grande entre o **SgC** e **SgF**. Assim vimos que os animais do **SgC** apresentam uma maior tendência à sobrevida, seguido do **SgF** e que os animais do **SgM** apresentaram a menor tendência de sobrevida.

Como descrito no método, foi realizada análise morfométrica do pulmão de 5 ratos de cada grupo, sendo que todos estes evoluíram para a morte antes de 24 horas, verificando o número de mononucleares e polimorfonucleares, sendo que os resultados encontram-se a seguir:

TABELA II: EFEITO DA CASTRAÇÃO PÓS-NATAL NA SEPSE EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR. NÚMERO DE MONONUCLEARES NO PULMÃO.

GRUPO	MONONUCLEARES	
	Média	Desvio Padrão
GC	15,40	3,13
SgM	38,20	4,86
SgF	31,00	6,40
SgC	20,40	7,79
TOTAL	29,86	9,65

Utilizando o teste estatístico ANOVA complementado com NEWMAN-KEULS, observamos que existe uma diferença estatística entre o GC e o SgM ($p < 0,001$), entre o GC e o SgF ($p < 0,01$) e não havendo diferença estatisticamente significativa entre o GC e o SgC.

Comparando os subgrupos do grupo experimento entre si, observamos que há uma diferença estatisticamente significativa entre os SgM e SgC ($p < 0,001$) e entre os SgF e SgC ($p < 0,01$). Entre os SgM e SgF não houve diferença estatística.

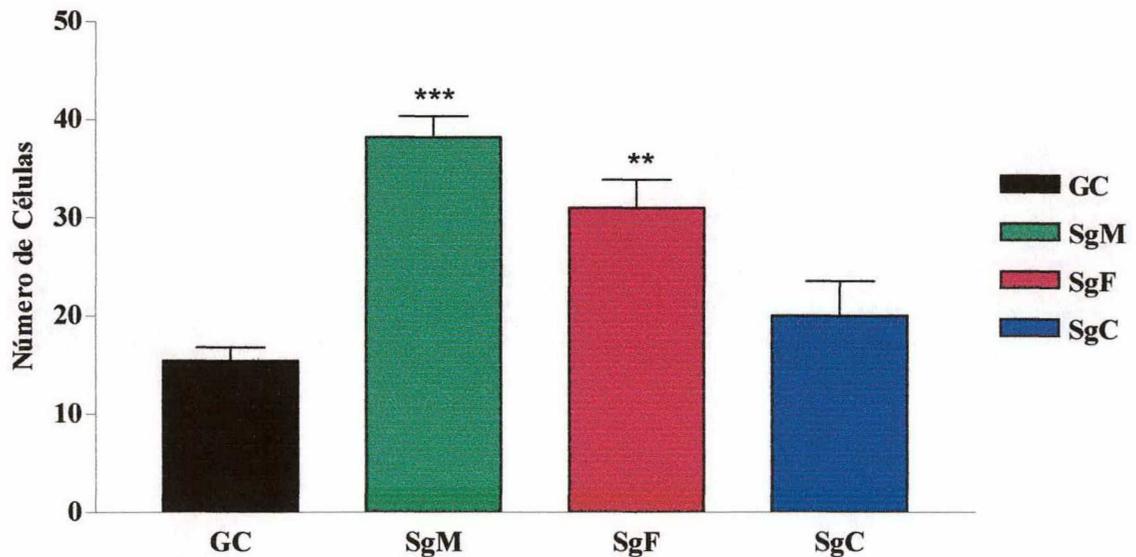


Figura 12 – Número de mononucleares no pulmão dos ratos Wistar em estudos conforme o grupo.

LEGENDA: ** = $p \leq 0,01$ e *** = $p \leq 0,001$, quando comparado com o GC.

TABELA III: EFEITO DA CASTRAÇÃO PÓS-NATAL NA SEPSE EXPERIMENTAL EM RATOS WISTAR. NÚMERO DE POLIMORFONUCLEARES NO PULMÃO.

GRUPO	POLIMORFONUCLEARES	
	Média	Desvio Padrão
GC	17,20	4,60
SgM	37,80	12,39
SgF	33,00	9,61
SgC	24,80	8,31
TOTAL	31,86	10,99

Analisando a média dos polimorfonucleares entre os diferentes grupos, utilizando o teste estatístico anteriormente descrito, observamos que há diferença estatística entre o GC e SgM e entre o GC e o SgF (ambos $p < 0,05$). Já entre os demais grupos não observamos diferença estatisticamente significativa.

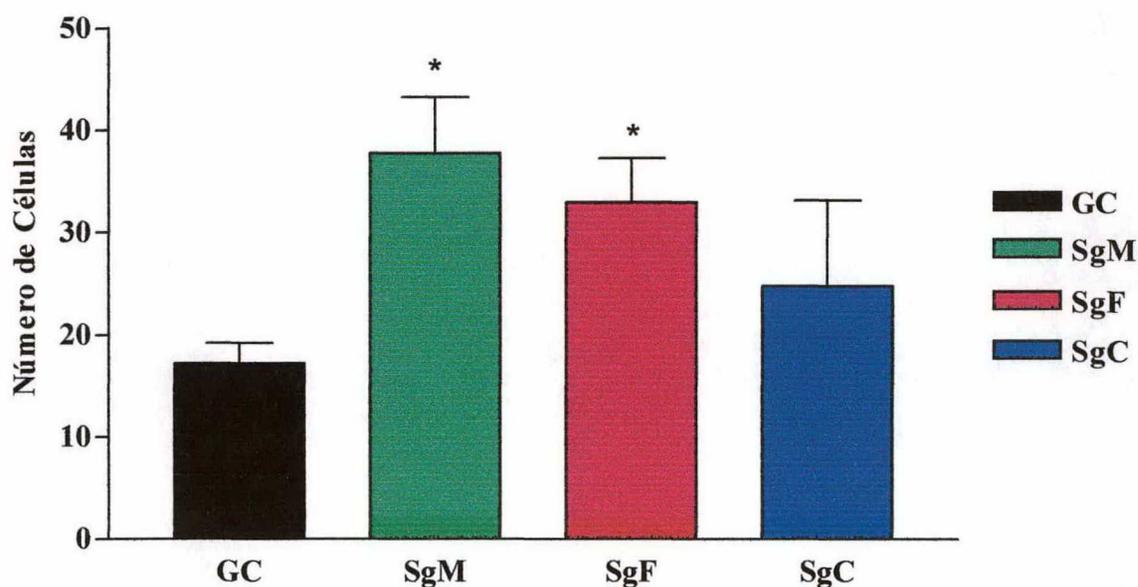


Figura 13 - Número de polimorfonucleares no pulmão dos ratos Wistar em estudos conforme o grupo.

LEGENDA: * = $p \leq 0,05$, quando comparado com o GC.

5. DISCUSSÃO

O problema, sepse de origem abdominal, é freqüente na prática médica, sendo discutido sem que se tenha chegado a um consenso ¹.

O modelo experimental é um dos principais meios para a resolução destes tópicos conflitantes sobre a sepse de origem abdominal. Acredita-se que o modelo experimental é o único método de estudo em que é possível avaliar e controlar os fenômenos sépticos desde a sua instalação até o momento de falência dos órgãos e sistemas, podendo-se interferir de diferentes formas e em diferentes tempos neste processo ¹.

A escolha do modelo de ligadura e perfuração do ceco para a indução da sepse, ocorreu pelo modelo estar bem definido na literatura, estando descrito em diversos trabalhos.

OTERO-ANTON ²⁹ relata que a ligadura e perfuração do ceco com incisão de 5 mm leva a uma mortalidade maior que 80% em 24 horas, e que em apenas 5 horas após a perfuração há hemocultura positiva, isolando bactérias do trato digestivo.

No entanto, vários trabalhos, tanto experimental como clínico, tem demonstrado que as fêmeas são mais resistentes a sepse que os machos, apresentando uma maior sobrevida ^{1,20,21}. Assim observamos:

ZELLWEGER ³⁰ observou que após sepse de origem polimicrobiana em ratos, a mortalidade era maior nos ratos machos, BÄUERLE ³¹ observou que as mulheres são menos susceptíveis e tem um melhor prognóstico na sepse, SCHRÖDER ²¹ mostrou que a taxa de sobrevida para as mulheres era maior que a dos homens na sepse, e WICHMANN ³² que também observaram que um número significativamente menor de mulheres necessita de cuidados intensivos após cirurgia, e que há uma menor incidência de sepse e choque séptico em mulheres do que em homens quando submetidos a cuidados intensivos, porém não observaram uma diferença na mortalidade entre ambos os sexos quando desenvolviam sepse aguda.

Observou-se, no decorrer deste experimento que as fêmeas têm uma tendência maior a sobrevida que os machos, e que em 24 horas após a indução da sepse, 33% das fêmeas permaneciam vivas, e todos os machos haviam evoluído para a morte.

Como WICHMANN ³³, em 1996, mostrou que há um dimorfismo na resposta imunológica entre ratos machos e fêmeas após choque hemorrágico, existindo uma resposta maior nas fêmeas em relação aos machos. Esta alteração deve-se a significativa alteração nos níveis de corticosteróides após o choque hemorrágico, que nos machos há um aumento e nas fêmeas não há alteração nos níveis ou até uma diminuição.

Em trabalho posterior, também em 1996, WICHMANN ³⁴ mostrou que a castração de ratos machos antes de choque hemorrágico previne a depressão da função imune mediada por células, mostrando um efeito benéfico na depleção de testosterona sobre a função imune celular após choque hemorrágico, não observando uma diferença entre os níveis de corticosteróide entre machos castrados e não castrados após choque hemorrágico, concluindo que a manutenção da imunidade nos animais castrado após choque hemorrágico pode não ter relação com os níveis de corticoisteróides e sim com a deficiência de testosterona.

O que foi observado neste trabalho, é que o subgrupo que apresentou a maior sobrevida à sepse nas primeiras 24 horas foi o SgC, ou seja, os animais submetidos a castração.

Tal fato, provavelmente, seja devido a diminuição do nível da testosterona plasmática, e do fato dos animais serem castrados em idade pré-pubere, eliminando o efeito deste esteróide gonadal sobre o seu desenvolvimento.

Como o pulmão é o primeiro órgão afetado pela sepse ^{1, 17}, comparamos os achados da literatura com os 3 subgrupos deste experimento. Neste trabalho propusemos fazer uma análise morfométrica dos leucócitos presente no pulmão dos animais.

PINE ³⁵ em estudo observando o mau funcionamento orgânico e a morte de pacientes com sepse de origem abdominal, observou que 28% dos pacientes que desenvolveram sepse apresentaram mau funcionamento pulmonar, sendo o pulmão o órgão mais afetado, e que 63% destes evoluíram para a morte.

Segundo RUNCIE ³⁶ o dano pulmonar provocado após infecção abdominal é causado por contribuições de leucócitos, plaquetas, microêmbolos, influências neurológica, sistema complemento, citocinas e radicais livres. A adesão de neutrófilos nos capilares pulmonares é um importante mecanismo no dano pulmonar. Refere também que o dano pulmonar pode ser limitado pela neutropenia.

Observou-se que os animais dos SgM e SgF apresentaram um número significativamente maior de mononucleares quando comparado ao GC, e que o SgC não

apresentou uma diferença estatística destas células comparando com o **GC**. Também observamos que houve uma diferença estatisticamente significativa quando comparando os **SgM** e **SgF** com o **SgC**, sendo o número de mononucleares maior nos 2 primeiros subgrupos. Assim observamos que o **SgC** apresentou-se mais semelhante ao **GC** neste aspecto.

Analisando os polimorfonucleares, vimos que o **SgM** e o **SgF** apresentaram um número estatisticamente maior quando comparado ao **GC**. Quando comparando o **SgC** com o **GC** não houve diferença estatística significativa.

Não foi encontrado trabalho semelhante na literatura, que utilizasse esta análise morfométrica pulmonar, para poder-se comparar estes resultados com a literatura.

Com isto, observou-se que em relação à análise morfométrica realizada nos pulmões, o **SgC** ficou mais próximo ao **GC**, o que era previamente esperado pois vimos na literatura que a diminuição do nível de testosterona circulante favorece uma melhor ativação do sistema imune, e por este grupo também ter apresentado uma maior tendência a sobrevida.

6. CONCLUSÕES

1. As alterações pulmonares observadas foram menores nos animais do Subgrupo Castrado e maiores no Subgrupo Macho e no Subgrupo Fêmea, sugerindo uma resposta inflamatória menor no Subgrupo Castrado.
2. Os animais do Subgrupo Castrado foram os que apresentaram uma maior tendência a sobrevida após a indução da sepse.

7. REFERÊNCIAS

1. d'Acampora AJ. Avaliação histológica da sepse experimental em ratos Wistar [Tese]. São Paulo: Escola Paulista de Medicina, 1996. 109 p.
2. Harris RL, Musher DM, Bloom K, Gathe J, Rice L, Sugarman B, Williams TW, Young EJ. Manifestations of Sepsis. Arch. Intern. Med 1987, 147: 1987-95.
3. Steinberg D. On leaving the peritoneal cavity open in acute generalized suppurative peritonitis. Am J Surg 1979, 137: 216-20.
4. Leiboff AR, Soroff HS. The treatment of generalized peritonitis by closed postoperative peritoneal lavage. Arch Surg 1987, 122: 1005-10
5. Marik PE, Varon J. The hemodynamic derangements in sepsis: implications for treatment strategies. Chest, 114(3): 854-60, 1998.
6. Stephen M, Loewenthal MS. Continuing peritoneal lavage in high-risk peritonitis. Surgery 1979, 85(6): 603-606
7. Mccauley RD, Heel KA, Christiansen KJ, Hall JC. The effect of minimum luminal nutrition on bacterial translocation and atrophy of the jejunum during parenteral nutrition. J. Gastroenterol Hepatol 1996, 11(1): 65-70.
8. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RMH, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. Chest 101:55, 1992.
9. Abraham E, Matthay MA, Dinarello CA, Vicent JL, Cohen J, Opal SM, Glauser M, parsons, p.; fisher, c.j.; repine, j.e.; Consensus conference definitions for sepsis, septic shock, acute lung injury, and acute respiratory distress syndrome: Time for a reevaluation, Crit Care Med 2000, 28(1): 232-35.
10. Fein AM, Calalang-Colucci MG. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in sepsis and septic shock, Critical Care Clinics 2000, 16(2): 289-317.

11. Bone RC, Fisher CJ, Clemer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. Sepsis syndrome: Avalid clinical entity, *Critical Care Medicine* 1989, 17(5): 389-96.
12. Christou NV. Sistemic and peritoneal host defense in peritonitis. *World J. Surg.* 14:184-90, 1990.
13. Meng XJ, Song XH, Li L, Li H. Organ- association phenomena during sepse. TNF and IL-6 in different macrophages. *Chin Med j.* 106:458:62, 1993.
14. Parker MM, Parrillo JE. *Septic Shock – Hemodynamics and Pathogenesis*, JAMA 1983, 250(24): 3324-3327.
15. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Robbins Pathologic basis of disesase*. 5. ed. Philadelphia, Saunders, 1994. 1400 p.
16. Bonin GS, d'Acampora AJ, Matte ELA, Suoza JL, Albuquerque MM, Silva MT, Ortellado DK, Carvalho ROM, Damas TB, Serafim JDM. Repercussão Histopatológica Renal da Sepse Experimental Tratada com Gentamicina. *Anais da XXXIV Jornada Catarinense de Debates Científicos e Estudos Médicos* 2000.
17. Aqel M. *Estudo Histológico de Pulmão de Ratos após Sepse Experimental de Origem Abdominal [Monografia]*. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 1996.
18. Wakefield CH, Barclay GR, Fearon KC, Goldie AS, Ross JA, Grant IS, et al. Proinflammatory mediator activity, endogenous antagonists and the systemic inflammatory response in intra-abdominal sepsis. *Br J Surg* 1998; 85 (6):818-25
19. d'Acampora AJ, Tramonte R, Carvalho ROM, Ortellado DK, Serafim JDM. Pulmão e Peritônio após Sepse Experimental de Origem Abdominal em Ratos Wistar. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões* 2001. Vol 28 (Suplemento 1): 276.
20. Oberholzer A, Kell M, Zellweger R, Steckholzer U, Trentz O, Ertel W. Incidence of septic complications and multiple organ failure in severely injured patients is sex specific. *Journal of Trauma* 2000, 48 (5): 932-37.
21. Schröder J, KahlkeV, Staubach KH, Zabel P, Stüber F. Gender differences in human sepsis, *Arch Surg* 1998, 133: 1200-1205.
22. Haas HS, Schauenstein K. Neuroimmunomodulation via limbic structures – The neuroanatomy of psychoimmunology. *Progress in Neurobiology* 1997; 51: 195-222.

23. Sanks N, McCormick CM, Meaney MJ. Sex differences in hypothalamic-pituitary-adrenal responding to endotoxin challenge in the neonate: reversal by gonadectomy. *Develop. Brain Research* 1994. 79:260-266.
24. Ahmed SA, Penhale WJ, Talal N. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases – Mechanisms of sex hormone action. *AJP* 1985 dec; 531-551.
25. Handa RJ, Burgess LH, Kerr JE, O'Keefe JA. Gonadal steroid hormone receptors and sex differences in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Hormones and Behavior* 1994; 28: 464-476.
26. Schuurs AHWM, Verheul, HAM. Effects of gender and sex steroids on the immune response. *J. Steroid Biochem.* 1990. 35(2): 157-172.
27. Golsteyn E, Fritzler MJ. Review: The role of thymus-hypothalamus-pituitary-gonadal axis in normal immune processes and autoimmunity. *The J. of Rheumatology* 1987; 14(5): 982-990.
28. Mandarim CA, Métodos quantitativos em morfologia. Rio de Janeiro: Eduerj; 1995.
29. Otero-Antón E, González-Quintela A, López-Soto A, López-Ben S, Llovo J, Pérez LF. Cecal Ligation and Puncture as a Model of Sepsis in the Rat: Influence of the Puncture Size on Mortality, Bacteremia, Endotoxemia and Tumor Necrosis Factor Alpha Levels. *European Surgical Reserch* 2001; 33 (2): 77-9.
30. Zellweger R, Wichmann MW, Ayala A, Stein S DeMaso C, Chaudry I. Females in proestrusstate maintain splenic immune functions and tolerate sepsis better tha males. *Crit Care Med* 1997; 25(1): 106-110.
31. Bäuerle R, Rücker A, Schmandra TC, Holzer K, Encke A, Hanisch E. Markov Cohort simulation study reveals evidence for sex-based difference in Intensive Care Unit patients. *Am J Surg* 2000; 179:207-11.
32. Wichmann MW, Zellweger R, DeMaso CM, Ayala A, Chaudry IH. Enhace immune responses in fameles. As opposed to decresed responses im males following hemorrhagic shock and resuscitation. *Cytokines* 1996; 8(11): 853-863.

33. Wichmann MW, Inthorn D, Andress HJ, Schildberg FW. Incidence and mortality of severe sepsis in surgical intensive care patients: the influence of patient gender on disease process and outcome. *Intensive Care Med* 2000; 26: 167-172.
34. Wichmann MW, Zellweger R, DeMaso CM, Ayala A, Chaudry IH. Mechanism of Immunosuppression in males following trauma-hemorrhage – Critical role of testosterone. *Arch Surg* 1996; 131: 1186-1192.
35. Pine RW, Wertz MJ, Lennard ES, Dellinger EP, Carrico CJ, Minschew BH. Determinants of organ malfunction or death in patients with intra-abdominal sepsis – A discriminant analysis. *Arch Surg* 1983; 118: 242-248.
36. Runcie MB, Ramsay G. Intraabdominal Infection: Pulmonary Failure. *World J of Surg* 1990; 14: 196-203.

NORMAS ADOTADAS

1. NORMATIZAÇÃO PARA OS TRABALHOS DE CONCLUSÃO DE CURSO DE GRADUAÇÃO EM MEDICINA. Resolução N° 001/2001 do colegiado do curso de graduação de Medicina da Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – 2001.
2. COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTO ANIMAL. Os princípios éticos da experimentação animal.
3. INTERNATIONAL ANATOMICAL NOMECLATURE COMMITTEE – Nomina anatômica. 5ª Ed. Rio de Janeiro, Medsi, 1987.
4. INTERNATIONAL ANATOMICAL NOMECLATURE COMMITTEE – Nomina histológica. 2ª Ed. New York, Ithaca, 1983.
5. d'Acampora AJ; Investigação Experimental – do Planejamento à Redação Final. Ed. Papa-Livros, Florianópolis – SC, 2001.

**TCC
UFSC
CC
0300**

N.Cham. TCC UFSC CC 0300
Autor: Serafim, João Dani
Título: Efeito da castração pós-natal na



972811959

Ac. 253122

Ex.1

Ex.1 UFSC BSCCSM