

ANTONIO AUGUSTO RIBEIRO DIAS PIRES

**O USO DO PRÓPOLIS VERDE E SEUS EFEITOS EM MODELO  
ANIMAL DE ADERÊNCIA PERITONEAL**

Rio de Janeiro

2023

ANTONIO AUGUSTO RIBEIRO DIAS PIRES

**O USO DO PRÓPOLIS VERDE E SEUS EFEITOS EM MODELO  
ANIMAL DE ADERÊNCIA PERITONEAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina.

Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Ferreira Manso  
Prof. Dr. Christina Maeda Takiya

Rio de Janeiro  
Março de 2023

Dias Pires, Antonio Augusto Ribeiro.

O uso do própolis verde e seus efeitos em modelo animal de aderência peritoneal. / Antonio Augusto Ribeiro Dias Pires. – Rio de Janeiro: UFRJ / Centro de Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina, 2023.

169 f.: il.; 31 cm.

Orientadores: José Eduardo Ferreira Manso e Christina Maeda Takiya.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro / Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas, 2023.

Referências: f. 93-97.

1. Peritônio. 2. Própole/uso terapêutico. 3. Aderências Teciduais. 4. Obstrução Intestinal. 5. Modelos Animais. 6. Cirurgia Geral. - Tese. I. Manso, José Eduardo Ferreira. II. Takiya, Christina Maeda. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas. IV. Título.

# FOLHA DE APROVAÇÃO

ANTONIO AUGUSTO RIBEIRO DIAS PIRES

## O USO DO PRÓPOLIS VERDE E SEUS EFEITOS EM MODELO ANIMAL DE ADERÊNCIA PERITONEAL

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Medicina

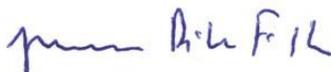
Aprovada em 27 de Março de Dois Mil e Vinte e Três



Prof. Dra. Christina Maeda Takiya – UFRJ  
Presidente da Banca e Orientadora



Prof. Dr. Leandro Miranda Alves - UFRJ  
Titular da Banca de defesa



Prof. Dr. Joaquim Ribeiro Filho – UFRJ  
Titular da Banca de defesa

## **DEDICATÓRIA**

**Dedico essa pesquisa à Sofia que me ensinou o que é o amor e ao Mateus que, mesmo pequenininho, me ensinou que toda a força vem da alma e mora do lado da alegria; Amo vocês mais do que pensei um dia ser capaz, meus filhos!**

**Dedico à Kaliani, pela preocupação, apoio e pela presença, nesse longo e cansativo período, obrigado por estar ao meu lado sempre, meu amor!**

**Dedico aos meus pais, irmãos, avós e todos da minha família, aos que estão comigo, aos que já se foram e aos que chegaram, do primeiro ao último dia da minha vida vocês estiveram e sempre estarão ao meu lado, me ensinando o certo, me acolhendo quando errado, mas principalmente, me amando e mostrando porquê a vida vale a pena!**

**Dedico aos meus amigos, companheiros que a vida me deu, mesmo ausente nesse período sempre me deram apoio e forças. A existência de vocês deixa a vida mais leve e divertida!**

**Dedico à Deus, que nunca deixou o meu lado e que em momentos de maior desesperança sempre se mostrou presente, com pequenos ou enormes milagres, obrigado por ter me concedido força, resiliência e sensibilidade!**

## **AGRADECIMENTOS**

**À Deus por sempre se mostrar presente e pela força que me dá sempre.**

**Aos meus filhos por existirem e me ensinarem a maravilha que é viver!**

**Aos meus pais, irmãos e avós por seu amor e apoio.**

**À minha esposa pelo amor e companhia, com toda sua família maravilhosa, que além de sempre acreditarem em mim, me acolheram como seus.**

**Ao meus orientadores: Professor José Eduardo Ferreira Manso, que com gentileza me guiou e tanto ensinou; e a Professora Christina Maeda Takiya, que me “adotou” e protegeu como eu jamais poderei agradecer.**

**À Professora Andresa Aparecida Berretta e Silva por acreditar em mim e à Apis Flora® que gentilmente forneceu o extrato de própolis utilizado nesta pesquisa.**

**Aos chefes do Serviço de Patologia do Hospital Naval Marcílio Dias, Cesar de Souza Bastos Junior e Antônio Carlos Almeida de Oliveira. À Camila Ferro Brito, Verônica Williames Lima, Daniela Silva Mello e Gabrielle Barbosa Vieira Ivantes por toda a preparação das lâminas histológicas.**

**Ao Marcus Vinícius Alves da Silva e Claudio Sergio Correa Lau Junior por terem me ajudado e ensinado tanto sobre os cuidados com os animais.**

**Aos estatísticos do IPB.**

**À Marinha do Brasil por ter me dado a possibilidade de evoluir tanto como pessoa como profissionalmente e a todos que lá participaram dessa minha jornada.**

**À biblioteca da Faculdade de Medicina da Silesia**

**Deixo meus sinceros agradecimentos.**

**“Quase é a maior distância que existe”**

(Citação própria)

## RESUMO

DIAS PIRES, Antonio Augusto Ribeiro. O uso do própolis verde e seus efeitos em modelo animal de aderência peritoneal. Dissertação (Mestrado em Medicina). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

As aderências peritoneais pós-operatórias têm grande impacto socioeconômico podendo causar, entre outros sintomas, dor crônica, infertilidade feminina, obstrução intestinal e levar à morte. Sua formação se dá principalmente por traumas ao peritônio, estímulos inflamatórios e ação de radicais livres. Como não há tratamento definido para a prevenção das aderências peritoneais e como o própolis tem ação anti-inflamatória e antioxidante, supôs-se, para este estudo, um efeito benéfico do própolis na prevenção de aderências peritoneais. Um dos possíveis motivos para a dificuldade no desenvolvimento de um tratamento eficaz é a falta de um modelo animal eficiente para a indução das aderências peritoneais, associado a falta de um método claro para comparação das aderências peritoneais. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da administração do extrato aquoso de própolis verde, na formação de aderências peritoneais, em ratos submetidos ao modelo animal de gastrotomia seguida de gastrorrafia. Para isso foi necessária a criação, caracterização e validação do novo modelo animal de gastrotomia seguida de gastrorrafia como um modelo eficiente na formação de aderências peritoneais e a criação, caracterização e validação de um novo método quantificável de classificação macroscópica das aderências peritoneais. Foram utilizados cinquenta e três ratos (*Rattus norvegicus*) machos e utilizado o extrato aquoso de própolis verde, similar ao EPP-AF®, tanto *per os* (gavagem), quanto por via tópica (intraperitoneal), avaliando sua ação no processo de formação das aderências peritoneais em ratos. Os animais tratados com própolis intraperitoneal após a realização da gastrotomia seguida de gastrorrafia apresentaram aderências mais extensas quando comparados com os animais submetidos a esse modelo e sem tratamento (grupo cirurgia). Os animais tratados com própolis *per os* na dosagem 100 mg/kg/dia apresentaram redução das aderências peritoneais em comparação com o grupo cirurgia. O modelo animal de gastrotomia

seguida de gastrorrafia mostrou-se eficaz para formar aderências em todos os animais e todas as aderências apresentavam o mesmo padrão. O novo método quantificável de classificação macroscópica das aderências peritoneais mostrou-se eficaz para avaliar e comparar com confiabilidade as alterações encontradas nas cavidades peritoneais.

**Palavras chave:** cirurgia geral; aderências teciduais; modelos animais; própolis; inflamação; obstrução intestinal; dor abdominal.

## ABSTRACT

DIAS PIRES, Antonio Augusto Ribeiro. O uso do própolis verde e seus efeitos em modelo animal de aderência peritoneal. Dissertação (Mestrado em Medicina). Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Postoperative peritoneal adhesions have great socioeconomic impact and can cause symptoms like chronic pain, female infertility, bowel obstruction and death. The adhesions formation occurs mainly due to peritoneal trauma, inflammatory stimuli and free radicals. As there is no definitive treatment to prevent adhesions and propolis has anti-inflammatory and antioxidant effects, it was assumed for this study, a potential beneficial action of propolis in the prevention of peritoneal adhesions. One of the possible reasons for the difficulty in developing an effective treatment is the lack of an efficient animal model for the induction of peritoneal adhesions, associated with the absence of a clear method for comparing peritoneal adhesions. The objective of this study was to evaluate the effect of the administration of aqueous extract of green propolis, on the formation of peritoneal adhesions, in rats submitted to the animal model of gastrotomy followed by gastrorrhaphy. This required the creation, characterization and validation of a new animal model of gastrotomy followed by gastrorrhaphy as an efficient model to induce the formation of peritoneal adhesions and the creation, characterization and validation of a new quantifiable method of macroscopic classification of peritoneal adhesions. Fifty-three male rats (*Rattus norvegicus*) were used and an aqueous extract of green propolis, similar to EPP-AF<sup>®</sup>, was used both *per os* (gavage) and topically (intraperitoneal), evaluating its action in the process of formation of peritoneal adhesions in rat. The animals treated with intraperitoneal propolis had more extensive adhesions when compared to the animals submitted to gastrotomy followed by gastrorrhaphy without any treatment (surgery group). The animals treated with propolis *per os* at a dosage of 100 mg/kg/day showed a reduction in peritoneal adhesions compared with the surgery group. The gastrotomy followed by gastrorrhaphy model, proved to be effective in forming adhesions in all animals and all the adhesions formed had the same pattern. The new quantifiable method of macroscopic

classification of peritoneal adhesions proved to be effective and reliable to evaluate and compare the alterations found on the peritoneal cavities.

**Key words:** general surgery; tissue adhesions; animal models; propolis; inflammation; intestinal obstruction; abdominal pain.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Imagem representativa da manutenção do dano inflamatório e oxidativo induzido pelo processo inflamatório desencadeado pela lesão peritoneal. ....	35
Figura 2 - Imagem representativa da resposta celular à concentração de radicais livres. Fonte: Adaptado de SIES et al. 2020 <sup>(63)</sup> . ....	38
Figura 3 - Imagem representativa do processo de deposição e degradação da fibrina na cicatrização do peritônio. ....	40
Figura 4 - Modelo de gastrotomia seguido de gastrorrafia. Fígado seta amarela, estômago após gastrotomia e gastrorrafia seta verde, baço seta vermelha. ....	55
Figura 5 - Perfil cromatográfico obtido por HPLC/DAD; 1: ácido cafeico; 2: ácido p-cumárico; 3: Ácido 3,5-dicafeoilquínico; 4: Ácido 4,5-dicafeoilquínico; 5: aromadendrina; 6: drupanina; 7: crisina; 8: galangina; 9: artepelin C e 10: bacharina. ....	56
Figura 6 - Divisão da parede abdominal com a cavidade abdominal em 21 quadrantes, sendo 9 quadrantes na parede, 3 quadrantes em cúpula diafragmática (direita, central e esquerda), e 9 quadrantes na cavidade abdominal. ....	60
Figura 7 - A1: Eletrocauterização do peritônio parietal com sobressutura. A2: Aspecto do peritônio no sétimo dia de pós-operatório. B1: Abrasão cecal. B2: Aspecto do ceco no sétimo dia de pós-operatório. Setas apontam áreas submetidas aos procedimentos cirúrgicos descritos nos modelos animais de aderência peritoneal. Setor em azul marca área de eletrocauterização com sobressutura do peritônio parietal. ....	64
Figura 8 - A, B e C: Imagens representativas de três animais submetidos à gastrotomia seguida de gastrorrafia. Fígado seta amarela, baço seta vermelha, estômago com epíplon seta verde, setas azuis apontam para áreas de aderência entre fígado, estômago e epíplon. ....	65
Figura 9 - Diagrama de caixa para a graduação de aderências peritoneais entre os grupos segundo o método quantificável de graduação macroscópica das aderências. ....	80
Figura 10 - Ratos do grupo controle, aspecto anatômico normal, sem aderências. ....	98

Figura 11 - Rato 1 do grupo simulação (sham), sem aderências, porém com alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. ....	100
Figura 12 - Rato 2 do grupo simulação (sham), sem aderências, porém com alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. ....	102
Figura 13 - Rato 3 do grupo simulação (sham), com aderências entre o epíplon e a parede abdominal em cicatriz mediana e entre a gordura epididimal e a parede abdominal em cicatriz mediana. ....	104
Figura 14 - Rato 4 do grupo simulação (sham), com aderências entre a gordura epididimal e a parede abdominal em cicatriz mediana e entre o fígado e a parede abdominal, em cicatriz mediana, por banda laminar de aderência sem adesão direita do órgão à parede. ....	106
Figura 15 - Rato 5 do grupo simulação (sham), com aderência entre a gordura epididimal e a parede abdominal em cicatriz mediana. ....	108
Figura 16 - Rato 6 do grupo simulação (sham), sem aderências, porém com alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. ....	110
Figura 17 - Rato 1 do grupo cirurgia, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon. Aderência entre o epíplon e o fígado fora da área de sutura gástrica, associado as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. ....	112
Figura 18 - Rato 2 do grupo cirurgia, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon. Aderência entre a parede abdominal e aglomerado de estruturas acometendo o fígado, o estômago e o epíplon, em quadrante superior esquerdo, associado as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. ....	114
Figura 19 - Rato 3 do grupo cirurgia, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago, o epíplon e a gordura epididimal. Aderência entre a parede abdominal e a gordura epididimal, tanto na cicatriz mediana como em toda extensão da hérnia incisional, associado as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. ....	116

- Figura 20 - Rato 3 do grupo cirurgia, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago, o epíplon e a gordura epididimal. Aderência entre a parede abdominal e a gordura epididimal, tanto na cicatriz mediana como em toda extensão da hérnia incisional, associado as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. .... 121
- Figura 21 - Rato 1 do grupo própolis tópico, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago, o epíplon e o baço. Aderência entre a parede abdominal e o aglomerado de estruturas acometendo o fígado, o estômago, o epíplon e o baço, em quadrante superior esquerdo, havia aderência entre o fígado e o diafragma (não visualizada nesta imagem). Focos de substância amarelada em áreas do peritônio parietal e visceral, associado as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. ....124
- Figura 22 - Rato 2 do grupo própolis tópico, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago, o epíplon, uma alça de delgado e o baço, com esse aglomerado aderindo à parede abdominal em quadrante superior esquerdo. Aderência entre a parede abdominal e a gordura epididimal e da gordura epididimal ao epíplon e alça de delgado, associado a focos de substância amarelada em áreas do peritônio parietal e visceral, associado as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. .... 127
- Figura 23 - Rato 3 do grupo própolis tópico, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago, o duodeno, o epíplon e o baço. Ausência de aderência acometendo a parede abdominal. Focos de substância amarelada em áreas do peritônio parietal e visceral, associado as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. .... 130
- Figura 24 - Rato 4 do grupo própolis tópico, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago, o epíplon, o baço e a fáscia de Gerota, associado a aderências entre as gorduras epididimais. Ausência de aderência acometendo a parede abdominal. Focos de substância amarelada em áreas do peritônio parietal e visceral, associado as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. .... 133
- Figura 25 - Rato 5 do grupo própolis tópico, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago, o epíplon, o baço e a fáscia de Gerota. Ausência de aderência acometendo a parede abdominal. Focos de substância amarelada em áreas do peritônio parietal e visceral, associado as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. .... 136

Figura 26 - Rato 6 do grupo própolis tópico, sem aderências acometendo a parede abdominal, apresentando aderência peritoneal acometendo o fígado, o estômago e o epíplon. Focos de substância amarelada em áreas do peritônio parietal e visceral, associado as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. ....	139
Figura 27 - Rato 1 do grupo própolis 100 mg/kg/dia, com mínimas aderências peritoneais entre o fígado e o estômago, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. ....	141
Figura 28 - Rato 2 do grupo própolis 100 mg/kg/dia, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. ....	143
Figura 29 - Rato 3 do grupo própolis 100 mg/kg/dia, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. ....	145
Figura 30 - Rato 4 do grupo própolis 100 mg/kg/dia, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. ....	147
Figura 31 - Rato 5 do grupo própolis 100 mg/kg/dia, presença de aderência laminar entre o epíplon e o diafragma em quadrante 12', associado as aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, além das alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. ....	149
Figura 32 - Rato 6 do grupo própolis 100 mg/kg/dia, presença de aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. ....	151
Figura 33 - Rato 1 do grupo própolis 300 mg/kg/dia, com aderências entre a gordura epididimal e a cicatriz mediana, entre o fígado e o diafragma e o aglomerado de estruturas que acomete a parede abdominal de hipocôndrio esquerdo, o fígado, o estômago, o epíplon e o baço, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. ....	154

Figura 34 - Rato 2 do grupo própolis 300 mg/kg/dia, com aderências entre o fígado e o epíplon e outra área entre o fígado, o estômago e o epíplon, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. ....	156
Figura 35 - Rato 3 do grupo própolis 300 mg/kg/dia, com aderência pontual entre o fígado e o epíplon, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. ..	158
Figura 36 - Rato 4 do grupo própolis 300 mg/kg/dia, com aderência entre o fígado, o estômago e o epíplon, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. ....	160
Figura 37 - Rato 5 do grupo própolis 300 mg/kg/dia, com aderência entre o fígado, o estômago e o epíplon, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. ....	162
Figura 38 - Rato 6 do grupo própolis 300 mg/kg/dia, com aderência pontual entre o fígado e o epíplon, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia. ..	164

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Graduação de aderências peritoneais segundo Evans et al <sup>(62)</sup> . .....	59
Tabela 2 - Graduação de aderências peritoneais segundo Nair et al <sup>(10)</sup> . .....	59
Tabela 3 - Graduação de aderências peritoneais proposta para este estudo. ....	61
Tabela 4 - Resultados segundo graduação de aderências peritoneais proposta por Evans <sup>(62)</sup> . .....	75
Tabela 5 - Resultados do teste U de Mann-Whitney para a graduação das aderências segundo a escala de Evans <sup>(62)</sup> . .....	76
Tabela 6 - Resultados segundo graduação de aderências peritoneais proposta por Nair <sup>(10)</sup> . .....	77
Tabela 7 - Resultados do teste U de Mann-Whitney para a graduação das aderências segundo a escala de Nair <sup>(10)</sup> . .....	78
Tabela 8 - Resultados segundo graduação do método quantificável de graduação macroscópica das aderências. ....	79
Tabela 9 - Resultados do teste U de Mann-Whitney para a graduação das aderências segundo o método quantificável de graduação macroscópica das aderências. ....	80

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3,5-DCQ: Ácido 3,5-dicafeoilquínico

4,5-DCQ: Ácido 4,5-dicafeoilquínico

AG: Agravantes

$\alpha$ -SMA: Alfa actina de músculo liso

bFGF: Fator básico de crescimento do fibroblasto

CAPE: Éster fenetílico do ácido cafeico ou cafeato de fenetila

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono ou gás carbônico

CONCEA: Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX-1: ciclo-oxigenase tipo 1

COX-2: ciclo-oxigenase tipo 2

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNase-1: Desoxirribonuclease 1

EPP-AF<sup>®</sup>: Extrato padronizado de própolis verde da Apis Flora<sup>®</sup>

EUA: Estados Unidos da América

GIST: Tumor estromal gastrointestinal

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrogênio

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HGF: Fator de crescimento do hepatócito

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

IA: Intensidade de aderência

IFN: Interferon

IFN- $\gamma$ : Interferon gama

IL-10: Interleucina 10

IL-13: Interleucina 13

IL-4: Interleucina 4

IL-6: interleucina 6

MMP: Metaloproteinases da matriz

MRSA: Staphylococcus aureus resistente a meticilina

MSSA: Staphylococcus aureus sensível a meticilina

NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina

NETs: Armadilhas extracelulares de neutrófilos

NF- $\kappa$ B: Fator nuclear kappa B

NO: Óxido nítrico

O<sub>2</sub><sup>-</sup>: Ânion superóxido

O<sub>2</sub>: Gás oxigênio

OH $\cdot$ : Radical hidroxila

PAI-1: Inibidor do ativador de plasminogênio 1

PAI-2: Inibidor do ativador de plasminogênio 2

PCI: Índice de Carcinomatose Peritoneal

PGE<sub>2</sub>: Prostaglandina-E<sub>2</sub>

PR: Picrosirius Red

RNA: Ácido ribonucleico

ROS: Espécies reativas de oxigênio

SOD: Superóxido desmutase

TA: Tipo de aderência

TGF- $\beta$ 1: Fator de crescimento transformador beta 1

TGF- $\beta$ 2: Fator de crescimento transformador beta 2

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral alfa

tPA: Ativador tecidual de plasminogênio

UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

uPA: Ativador do plasminogênio tipo uroquinase

VEGF: Fator de crescimento endotelial vascular

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	25
1.1 Fundamentação Teórica .....	27
1.1.1 O que são as aderências .....	27
1.1.2 O impacto econômico das aderências peritoneais .....	28
1.1.3 As complicações encontradas em pacientes com aderências peritoneais .....	28
1.1.4 Como se formam as aderências peritoneais.....	29
1.1.4.1 A fisiopatologia da formação das aderências peritoneais.....	30
1.1.4.2 O papel da isquemia.....	35
1.1.4.3 O estresse oxidativo .....	36
1.1.4.4 O desequilíbrio do ciclo da fibrina na formação da aderência peritoneal .....	38
1.1.5 Métodos para prevenção da formação de aderências peritoneais .....	41
1.1.6 O própolis .....	44
1.1.5.1 O efeito antioxidante do própolis .....	46
1.1.5.2 O efeito anti-inflamatório da própolis .....	47
1.1.5.3 O efeito antimicrobiano do própolis .....	47
1.1.5.4 O efeito antitumoral do própolis.....	48
1.1.5.5 O própolis verde .....	48
1.1.6 Os métodos de criação e de avaliação das aderências na cirurgia experimental .....	49
1.2 Justificativa .....	49
2. OBJETIVOS .....	50
2.1 Objetivo Geral .....	50
2.2 Objetivos Específicos.....	50
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1 Aprovação da CEUA.....	51
3.2 Seleção dos animais e cuidados perioperatórios.....	51
3.2.1 Cuidados pré-operatórios .....	51
3.2.2 Anestesia .....	51
3.2.3 Cuidados intra-operatórios.....	52
3.2.4 Cuidados pós-operatórios.....	52
3.2.5 Eutanásia e necropsia .....	52

3.2.6 Histologia .....	53
3.3 Projeto piloto e desenvolvimento do modelo de Gastrotomia seguida de Gastrorragia .....	54
3.4 Própolis .....	55
3.5 Grupos da pesquisa .....	56
3.5.1 Grupo controle .....	56
3.5.2 Grupo simulação (Sham) .....	57
3.5.3 Grupo cirurgia (gastrotomia seguida de gastrorragia).....	57
3.5.4 Grupo própolis tópico.....	57
3.5.5 Grupo própolis enteral na dosagem 100mg/kg/dia .....	57
3.5.6 Grupo própolis enteral na dosagem 300mg/kg/dia .....	58
3.6 Modelos macroscópicos de avaliação das aderências .....	58
3.7 Análise estatística .....	62
3.8 Materiais .....	62
4 RESULTADOS .....	64
4.1 Projeto piloto e desenvolvimento do novo Modelo animal de Aderência Peritoneal .....	64
<b>4.2 Grupo Controle</b> .....	66
<b>4.3 Grupo Simulação (Sham)</b> .....	66
4.3.1 Rato 01 .....	66
4.3.2 Rato 02 .....	66
4.3.3 Rato 03 .....	67
4.3.4 Rato 04 .....	67
4.3.5 Rato 05 .....	67
4.3.6 Rato 06 .....	67
<b>4.4 Grupo Cirurgia</b> .....	67
4.4.1 Rato 01 .....	68
4.4.2 Rato 02 .....	68
4.4.3 Rato 03 .....	68
4.4.4 Rato 04 .....	68
4.4.5 Rato 05 .....	68
4.4.6 Rato 06 .....	69
<b>4.5 Grupo Própolis Tópico</b> .....	69

4.5.1 Rato 01 .....	69
4.5.2 Rato 02 .....	70
4.5.3 Rato 03 .....	70
4.5.4 Rato 04 .....	70
4.5.5 Rato 05 .....	70
4.5.6 Rato 06 .....	71
<b>4.6 Grupo Própolis 100 mg/kg/dia .....</b>	<b>71</b>
4.6.1 Rato 01 .....	71
4.6.2 Rato 02 .....	71
4.6.3 Rato 03 .....	72
4.6.4 Rato 04 .....	72
4.6.5 Rato 05 .....	72
4.6.6 Rato 06 .....	72
<b>4.7 Grupo Própolis 300 mg/kg/dia .....</b>	<b>72</b>
4.7.1 Rato 01 .....	73
4.7.2 Rato 02 .....	73
4.7.3 Rato 03 .....	73
4.7.4 Rato 04 .....	73
4.7.5 Rato 05 .....	74
4.7.6 Rato 06 .....	74
4.8 Análises estatísticas.....	74
4.8.1 Análises estatísticas dos resultados obtidos segundo a graduação descrita por Evans <sup>(62)</sup> .....	74
4.8.2 Análises estatísticas dos resultados obtidos segundo a graduação descrita por Nair <sup>(10)</sup> .....	76
4.8.3 Análises estatísticas dos resultados obtidos segundo o método quantificável de graduação macroscópica das aderências.....	78
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
5.2 Modelos animais de indução de aderência peritoneal. ....	81
5.3 Métodos de avaliação macroscópica das aderências. ....	83
5.4 Resultados obtidos com o uso do própolis.....	85
5.4.1 O própolis tópico.....	85
5.4.2 O própolis enteral.....	87

6 CONCLUSÃO.....	92
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	93
APÊNDICE A - RELATÓRIO DE CÁLCULOS DO RESULTADO .....	98
<b>1 Grupo Controle</b> .....	98
<b>2 Grupo Simulação (Sham)</b> .....	99
2.1 Grupo Simulação (Sham) - Rato 01.....	99
2.2 Grupo Simulação (Sham) - Rato 02.....	101
2.3 Grupo Simulação (Sham) - Rato 03.....	103
2.4 Grupo Simulação (Sham) - Rato 04.....	105
2.5 Grupo Simulação (Sham) - Rato 05.....	107
2.6 Grupo Simulação (Sham) - Rato 06.....	109
<b>3 Grupo Cirurgia</b> .....	111
3.1 Grupo Cirurgia - Rato 01.....	111
3.2 Grupo Cirurgia - Rato 02.....	113
3.3 Grupo Cirurgia - Rato 03.....	115
3.4 Grupo Cirurgia - Rato 04.....	117
3.5 Grupo Cirurgia - Rato 05.....	119
3.6 Grupo Cirurgia - Rato 06.....	120
<b>4 Grupo Própolis Tópico</b> .....	122
4.1 Grupo Própolis Tópico - Rato 01 .....	122
4.2 Grupo Própolis Tópico - Rato 02 .....	125
4.3 Grupo Própolis Tópico - Rato 03 .....	128
4.4 Grupo Própolis Tópico - Rato 04 .....	131
4.5 Grupo Própolis Tópico - Rato 05 .....	134
4.6 Grupo Própolis Tópico - Rato 06 .....	137
<b>5 Grupo Própolis 100 mg/kg/dia</b> .....	140
5.1 Grupo Própolis 100 mg/kg/dia - Rato 01 .....	140
5.2 Grupo Própolis 100 mg/kg/dia - Rato 02.....	142
5.3 Grupo Própolis 100 mg/kg/dia - Rato 03.....	144
5.4 Grupo Própolis 100 mg/kg/dia - Rato 04.....	146
5.5 Grupo Própolis 100 mg/kg/dia - Rato 05.....	148
5.6 Grupo Própolis 100 mg/kg/dia - Rato 06.....	150

<b>6 Grupo Própolis 300 mg/kg/dia</b> .....	152
6.1 Grupo Própolis 300 mg/kg/dia - Rato 01 .....	152
6.2 Grupo Própolis 300 mg/kg/dia - Rato 02.....	155
6.3 Grupo Própolis 300 mg/kg/dia - Rato 03.....	157
6.4 Grupo Própolis 300 mg/kg/dia - Rato 04.....	159
6.5 Grupo Própolis 300 mg/kg/dia - Rato 05.....	161
6.6 Grupo Própolis 300 mg/kg/dia - Rato 06.....	163
ANEXO A - APROVAÇÃO DA CEUA.....	165
ANEXO B - DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS DO PROPOLIS UTILIZADO NA PESQUISA.....	166
Determinação de flavonoides totais expressos em quercetina .....	166
Preparo do Reagente Cloreto de Alumínio 5,0% (p/v) .....	166
Preparo do Padrão .....	166
Preparo da Amostra.....	166
Condições espectrofotométricas.....	166
Determinação de compostos fenólicos e derivados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) .....	167
Preparo da Fase Móvel - Água acidificada com ácido fórmico 0,1% (v/v) .....	167
Preparo dos Padrões.....	167
Preparo da Amostra.....	167
Condições cromatográficas .....	167

## INTRODUÇÃO

As aderências peritoneais ocorrem quando há a formação de união entre áreas distintas do peritônio (parietal e/ou visceral), que antes estavam separadas, com a criação de um tecido cicatricial ligando duas ou mais destas áreas. Esse tecido cicatricial é formado por tecido conjuntivo, pode ter espessura variável, ser uma faixa fibrosa entre as estruturas ou unir diretamente as superfícies dos órgãos acometidos, aparecendo entre os órgãos abdominais ou entre os órgãos abdominais e o peritônio parietal<sup>(1, 2)</sup>.

É uma importante causa de morbidade e mortalidade que pode ser encontrada frequentemente após algum dano ao peritônio<sup>(1-12)</sup>. As aderências podem causar dores crônicas abdominal e pélvica, infertilidade feminina, gravidez ectópica, obstrução intestinal, suboclusão intestinal, fístulas, infartos intestinais e infecções sistêmicas. Estas complicações podem levar a reinternações e reoperações, nestas, além do aumento do tempo operatório, há maior dificuldade técnica na realização do procedimento cirúrgico e risco de lesão inadvertida de alças que, como consequência, possui maior risco de complicações e piora da qualidade de vida<sup>(1-21)</sup>. Todas estas complicações geram enormes custos ao sistema de saúde, chegando a bilhões de dólares todos os anos nos Estados Unidos da América (EUA) <sup>(1, 2, 5, 7, 9, 13, 14)</sup>. Pela grande prevalência e impacto socioeconômico, as aderências peritoneais são um problema de saúde pública e um campo de pesquisa com amplo potencial a ser explorado.

As causas mais aceitas para formação de aderências peritoneais são: inflamação, isquemia, trauma cirúrgico, infecções, estresse oxidativo, deiscências de suturas, abscessos, inflamação peritoneal, sangramento e presença de coágulos, radiação, corpo estranho, uso de drenos, a manipulação vigorosa dos órgãos, o ressecamento do

peritônio dos órgãos abdominais, a pressão excessiva do pneumoperitônio e a concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) no gás instilado. Doenças pré-existentes como diabetes, doenças proliferativas, endometriose, câncer e até mesmo o estado nutricional do paciente podem desencadear ou propiciar a formação de aderências peritoneais<sup>(1, 2, 5, 7-9, 11, 13, 15, 16, 22)</sup>.

Não há consenso quanto ao tratamento/prevenção das aderências, quanto ao melhor modelo animal para a indução da formação das aderências peritoneais ou quanto ao método macroscópico para avaliação e classificação das aderências. Essa grande variabilidade de formas de criar aderências e modos de analisá-las, dificulta a comparação entre os diferentes graus de aderências encontrados nas pesquisas e principalmente a comparação entre diferentes estudos, podendo ser um dos motivos na dificuldade em definir um padrão na prevenção das aderências<sup>(4, 19)</sup>.

Tendo em vista os efeitos anti-inflamatório e antioxidante do própolis, acredita-se que, hipoteticamente, poderia alterar o processo de formação de aderências peritoneais, podendo reduzir ou até mesmo inibir a formação de aderências. Além desses efeitos, o própolis possui efeito imunomodulador, antimicrobiano, antiangiogênico e pró-cicatrizante, apresentando ainda efeito hepatoprotetor. Esta substância foi capaz de aumentar a função cognitiva, reduzir o colesterol total, aumentando HDL em ratos, com redução do risco cardiovascular, melhorando o prognóstico em doenças crônicas e revertendo a neuroinflamação induzida por isquemia. É uma substância utilizada há milênios pela humanidade, inclusive como nutracêutico, sem efeito tóxico conhecido<sup>(15, 23-30)</sup>.

Tendo em vista os efeitos anti-inflamatório e antioxidante do própolis, acredita-se

que, hipoteticamente, poderia alterar o processo de formação de aderências peritoneais, podendo reduzir ou até mesmo inibir a formação de aderências. Por esse motivo foi proposto avaliar o impacto da administração do extrato aquoso de própolis verde na formação de aderências peritoneais pós-cirúrgicas.

## **1.1 Fundamentação Teórica**

### **1.1.1 O que são as aderências**

O primeiro relato na literatura do achado de aderências peritoneais foi em 1836 durante a necropsia de um paciente portador de tuberculose peritoneal<sup>(2)</sup>. Em 1849, para justificar esse achado, foi sugerido que vasos linfáticos coagulados se tornariam aderências<sup>(2)</sup>. Muito já se sabe sobre a fisiopatologia das aderências peritoneais, entretanto ainda não está completamente elucidada.

Aderências peritoneais originam-se da união não anatômica, seja ela congênita ou adquirida<sup>(2, 9)</sup>, entre áreas na cavidade peritoneal que podem ser de segmentos das alças do trato gastrointestinal, do epíplon, do fígado e etc., podendo estar ou não acometendo a parede abdominal. Podem ter aspecto laminar, serem pontes espessas e fibrosas ou até mesmo ligar diretamente uma estrutura à outra<sup>(1, 2, 5)</sup>. Essas pontes de aderência contém vasos sanguíneos ou fibras nervosas neoformadas<sup>(1, 2)</sup> e a presença dessas fibras nervosas poderiam justificar os quadros de dor crônica encontrados em alguns pacientes, explicando porque, após o procedimento cirúrgico para correção das aderências peritoneais, geralmente ocorre a resolução dos sintomas algícos, mesmo quando ocorre somente a secção cirúrgica das aderências sem encontrar outras possíveis causas para a dor como a presença de hérnias internas ou encarceramento de vísceras.

As aderências geralmente são pós-operatórias<sup>(2, 6, 9)</sup>, mas também pode ter sua origem em processos inflamatórios e infecciosos<sup>(2, 6, 9)</sup>, trauma<sup>(6)</sup> e reação fibroproliferativa<sup>(6)</sup>. As aderências consideradas permanentes são as que não podem mais ser degradadas por processos homeostáticos, evoluindo com a diferenciação das fibras de colágeno e proliferação de capilares sanguíneos. A aderência estará completamente formada em torno de 10 dias, a transformação em tecido cicatricial ocorre

em no mínimo 4 a 6 semanas e pode começar a ser encontrada regressão a partir de 2 meses<sup>(20)</sup>.

As aderências podem ser: do tipo 1, ou seja aderências que se formam em áreas onde nunca houve formação de aderências e são divididas em 1A, quando nunca houve procedimento operatório na região da aderência e 1B quando houve manipulação operatória prévia à formação da aderência; ou do tipo 2 quando as aderências são formadas no mesmo local onde uma aderência prévia já foi desfeita cirurgicamente. Essas aderências do tipo 2 podem ser classificadas como 2A, quando não houve qualquer outro procedimento cirúrgico além da adesiólise, que é o tratamento cirúrgico realizado com a secção das aderências e a liberação das estruturas aderidas e o tipo 2B, quando houve outro tipo de procedimento cirúrgico além da adesiólise<sup>(2, 9)</sup>.

#### 1.1.2 O impacto econômico das aderências peritoneais

As aderências peritoneais geram custos altos, chegando a bilhões de dólares todos os anos nos EUA<sup>(2, 5, 7, 12-14, 17)</sup> onde há uma taxa de hospitalização relacionada a aderências peritoneais de 117 internações para cada 100.000 habitantes<sup>(2)</sup>. Outro estudo refere que, de todas internações neste país, 1% delas são relacionadas às aderências peritoneais<sup>(5, 9)</sup>. Em um estudo, com 24 anos de acompanhamento, no hospital de Westminster, em Londres, percebeu-se que 0,9% das internações foram por obstrução intestinal<sup>(2)</sup>. Alguns países europeus referem gastar mais com aderências peritoneais do que com câncer gástrico e quase tanto quanto o que se gasta com o tratamento do câncer colorretal<sup>(2)</sup>. Esse gasto inclui procedimentos cirúrgicos, internação e reabilitação, lembrando-se ainda da perda de produtividade, já que é a maior causa de morbidade após laparotomias<sup>(2,12-14, 16)</sup>.

#### 1.1.3 As complicações encontradas em pacientes com aderências peritoneais

As aderências peritoneais pós-operatórias tem uma prevalência muito variada entre os estudos, sendo encontradas de 55 a 100 % dos casos<sup>(1, 2, 4, 5, 6-12, 14)</sup> e são importante causa de morbidade e mortalidade, podendo evoluir com dor crônica, obstrução intestinal, obstrução ureteral, infertilidade feminina, gravidez ectópica, infarto intestinal, formação de fístulas, abscessos, infecções sistêmicas, aumento do tempo para

acessar a cavidade peritoneal e maior risco de lesão às vísceras intra-abdominais em cirurgias subsequentes, necessidade de novas operações e redução da qualidade de vida<sup>(1, 2, 6-9, 12, 13, 15, 17-20)</sup>. São uma das principais causas de reoperação nos 10 primeiros anos que se seguem à cirurgia abdominal<sup>(16)</sup>, podendo ter complicações relacionadas as aderências vários anos após cirurgia inicial<sup>(2)</sup>. Cerca de 15% dos pacientes com aderências peritoneais desenvolvem obstrução intestinal e precisam de cirurgias para a realização da lise das aderências, que apresentam alta taxa de recorrência<sup>(4)</sup>. A mortalidade varia conforme o estudo, variando de 4,3 a 20%<sup>(4, 7)</sup> ou cerca de 2000 mortes ao ano nos EUA por obstrução intestinal<sup>(6)</sup>.

Aderências peritoneais são a causa mais comum de obstrução intestinal<sup>(2, 9)</sup>, sendo responsáveis por 30% a 40% das síndromes obstrutivas, podendo chegar até 74% considerando as que envolvem exclusivamente o intestino delgado<sup>(5, 11, 12)</sup>. As aderências também são a principal causa de infertilidade feminina secundária<sup>(12)</sup>.

A incidência das aderências peritoneais varia conforme o sítio operatório, sendo encontrada entre 24% e 83 % dos pacientes submetidos a cesariana e de 55% a 100% nas pacientes submetidas a cirurgias ginecológicas<sup>(3)</sup>, acometendo aproximadamente 25% das pacientes submetidas à operações tubo-ovarianas e cerca de 15% das cirurgias de vesícula biliar ou cólon<sup>(5)</sup>. Essas diferenças na incidência de aderências peritoneais poderiam ser justificadas ao se atribuir a causa à diferença da concentração de integrinas presente nas serosas do peritônio ou órgãos intraperitoneais. Integrinas são moléculas dependentes de cálcio que facilitam a adesão celular à matriz extracelular<sup>(5)</sup>, porém essa relação causal estrita ainda precisa ser melhor avaliada.

#### 1.1.4 Como se formam as aderências peritoneais

As aderências peritoneais se desenvolvem de 5 a 7 dias após dano peritoneal decorrente de um processo irritativo ao peritônio. Esse dano pode ser mecânico ou químico, inflamação, infecção, estresse oxidativo, isquemia, necrose, coágulos ou sangue residual na cavidade peritoneal, corpo estranho, toxinas, radiação, câncer, endometriose, sendo entre esses, o principal fator causador, o trauma cirúrgico<sup>(1-4, 8, 9, 13, 15, 16, 20, 21)</sup>. Seu aparecimento é resultado de um processo anômalo de reparação após o trauma peritoneal, onde após o dano ao mesotélio do peritônio inicia-se um processo

inflamatório com aumento da permeabilidade vascular, culminando com deposição de fibrina, matriz extracelular e migração celular, sendo a fibrinólise debilitada, o principal fator causal da criação das aderências<sup>(3, 7, 10, 16)</sup>. O maior motivo de o trauma cirúrgico ser tão adesiogênico é a presença de múltiplos estímulos danosos concomitantes, como a manipulação vigorosa de estruturas intraperitoneais, a presença de corpo estranho, resquícios de coágulos ou sangue, isquemia e infecção<sup>(16)</sup>. Esse dano operatório pode ser minimizado com umidificação constante das estruturas, manipulação delicada no peroperatório, hemostasia rigorosa, minimizar a isquemia ao manter boa vascularização das estruturas e técnicas de sutura apropriadas<sup>(3, 9, 16)</sup>.

Apesar do advento da laparoscopia ter reduzido o trauma cirúrgico é importante observar que alguns fatores inerentes a esse tipo de abordagem operatória pode induzir a formação de aderências, como o excesso da pressão do pneumoperitônio, a falta de umidificação do gás, o gás frio e com alto fluxo de infusão, além do próprio CO<sub>2</sub> que parece induzir inflamação, ressecamento e isquemia com redução da atividade fibrinolítica (notada em ratos)<sup>(3, 5, 16)</sup>. O aquecimento do CO<sub>2</sub>, sua umidificação e a introdução de 3% de oxigênio (O<sub>2</sub>) à mistura de gás insuflado, associado a atenção de não realizar dissecação tecidual excessiva, tem o poder de reduzir a ação pró-adesiogênica, havendo evidências de que existe correlação entre a infiltração de monócitos e neutrófilos e a presença de áreas com trauma hipóxico<sup>(2, 3, 8, 16)</sup>

#### 1.1.4.1 A fisiopatologia da formação das aderências peritoneais

Basicamente a fisiopatologia da formação da aderência se inicia por um processo inflamatório (que pode ter inúmeras causas)<sup>(8)</sup>, com a liberação de citocinas e a hipóxia que tem importante ação na formação de aderências. Por fim existe a incapacidade de degradar de forma eficaz a fibrina e a matriz extracelular, permitindo o aparecimento das aderências<sup>(9)</sup>.

Todo o processo de formação de aderências se baseia na necessidade de reparar o peritônio danificado, tratando-se do processo de cicatrização de feridas, sendo que qualquer distúrbio neste processo pode levar a formação de aderências peritoneais<sup>(1)</sup>. Diferentemente do processo de cicatrização de feridas que ocorre na pele, que cicatriza das bordas para o centro da lesão, no dano peritoneal a ferida cicatriza como um todo,

ao mesmo tempo, independentemente do tamanho da lesão. As células que serão as responsáveis por levar à cicatrização vem do tecido conjuntivo que era recoberto pela fina camada mesotelial do peritônio<sup>(20, 28)</sup>.

Microscopicamente o peritônio é constituído por uma camada única de células mesoteliais, que sintetizam surfactantes, fosfolípidios e glicosaminoglicanas, que se dispõem sobre as microvilosidades das células mesoteliais criando um microambiente que promove a lubrificação da superfície visceral do peritônio<sup>(31)</sup>. As células mesoteliais têm características epiteliais e mesenquimais, que em condições fisiológicas e patológicas, podem sofrer transformações<sup>(32)</sup>. O peritônio é uma membrana semipermeável em condições fisiológicas<sup>(33, 34)</sup>, mas em situações de agressão, como após diálise peritoneal, pode sofrer transição mesotelial-mesenquimal causando fibrose peritoneal<sup>(35-37)</sup>. Além disso as células mesoteliais do peritônio possuem uma capacidade limitada de absorver bactérias, moléculas químicas e outras substâncias, funcionando como uma barreira protetora<sup>(38)</sup>. Estas células exercem alguns papéis como o de iniciar respostas inflamatórias, ao apresentar antígenos às células imunes e de secreção de citocinas<sup>(39)</sup>, além da atividade fibrinolítica, onde ao dissolver a fibrina, podem prevenir a formação de aderências peritoneais<sup>(40)</sup>.

As células mesoteliais repousam em uma membrana basal que está em íntimo contato com o tecido conjuntivo e possui inúmeras células como fibroblastos, macrófagos e linfócitos, além de adipócitos, fibras nervosas, vasos sanguíneos e linfáticos<sup>(20)</sup>. Após o dano ao mesotélio a infiltração de leucócitos ocorre rapidamente, iniciando a cascata inflamatória com a liberação de citocinas e ativação do sistema de coagulação. Histamina e outras moléculas sinalizadoras estimulam os vasos sanguíneos, aumentando sua permeabilidade, causando a exsudação de células inflamatórias e a saída de fibrinogênio. A cascata de coagulação se inicia, protrombina se transforma em trombina e ocorre a formação do coágulo, com a ativação do fibrinogênio pela trombina. Citocinas liberadas pelas plaquetas, juntamente com os produtos da degradação dos coágulos, ativam o sistema complemento e há a formação de moléculas citoatrativas que promovem o recrutamento adicional de macrófagos, neutrófilos, linfócitos, mastócitos e células mesoteliais<sup>(31)</sup>.

Os neutrófilos são as células imunes mais abundantes na circulação sanguínea, sendo considerados a primeira linha de defesa do sistema imune inato e a principal subpopulação leucocitária envolvida nas fases iniciais da reparação tecidual, por isso são imediatamente recrutados para as zonas de injúria tecidual, onde permanecem por cerca de 2 dias<sup>(41-43)</sup>. Em resposta à infecção e/ou injúria, os neutrófilos formam redes extracelulares (NETs) que consistem de filamentos de alto peso molecular do DNA, estruturados como redes ou arcabouços. Estes filamentos estão entremeados com histonas e outras proteínas citotóxicas derivadas dos neutrófilos como a mieloperoxidase e a elastase neutrofílica<sup>(44, 45)</sup>. As NETs são liberadas pelos neutrófilos quando ocorre a morte celular programada, chamada de NETose, pela liberação do núcleo ou de uma parte dele, não associada a lise celular e pela liberação do DNA mitocondrial<sup>(44)</sup>. Elas têm ação dupla pois, além de exercerem a regulação da homeostasia, também regulam a inflamação patológica<sup>(46)</sup>. Durante uma infecção, elas exibem funções antimicrobianas ao encarcerarem e eliminarem patógenos extracelulares presentes na corrente sanguínea e nos tecidos<sup>(47)</sup>. As NETs também se formam durante o processo inflamatório asséptico, estimulam a adesão plaquetária, a coagulação<sup>(48)</sup> e, sua atividade proteolítica, contribui para a resolução da inflamação<sup>(49)</sup>.

Porém a produção inapropriada das NETs tanto do ponto de vista espacial como temporal causa efeitos deletérios, esse excesso de formação pode aumentar o dano tecidual e é encontrado em inúmeras afecções como na infecção pela COVID, em doenças autoimunes, na sepse, na lesão causada pela isquemia/reperfusão, entre outras. O denominador comum nestas situações é o seu envolvimento como mediadores de trombose e hiperinflamação que pode levar à oclusão de vasos e ductos<sup>(45, 47, 50-58)</sup>. Descobriu-se que as NETs têm ação no processo adesiogênico ao tratar camundongos com desoxirribonuclease 1 (DNase-1), que é uma enzima que cliva o ácido desoxirribonucleico (DNA), e obter redução na formação das aderências peritoneais<sup>(18)</sup>.

Os monócitos secretam uma série de citocinas como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-1 (IL-1) que são diretamente relacionadas ao grau de adesão. Cerca de  $62,3 \pm 8,2\%$  dos monócitos do líquido peritoneal se transformam em macrófagos nas primeiras 24 horas que se seguem ao dano. Os macrófagos então se

reúnem no sítio da lesão, liberando IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 e outras citocinas envolvidas na cicatrização da ferida, além do ativador de plasminogênio tecidual (tPA) que participa no processo de fibrinólise<sup>(59)</sup>.

Os macrófagos ativados apresentam diversos fenótipos, os tipos mais comuns são os de tipo M1, ou macrófagos clássicos e os do tipo M2, alternativamente ativados. Os macrófagos M1, que se acumulam nos estágios iniciais da lesão do peritônio, secretam citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  e têm a capacidade de eliminar micro-organismos, ativar a óxido nítrico sintase induzida (iNOS), secretar radicais livres e causar lesão tecidual. Os macrófagos M2 têm papel anti-inflamatório nos estágios finais da inflamação e promovem reparação tecidual e fibrose<sup>(59)</sup>.

Os neutrófilos ativados e os macrófagos podem causar dano oxidativo ao mesotélio e promover a formação de aderências<sup>(60)</sup>. O excesso de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) produzidos são citotóxicos e podem matar as células endoteliais, plaquetas, fibroblastos e outras células<sup>(22)</sup>. A citólise e a peroxidação lipídica das membranas celulares podem levar ao aumento da permeabilidade vascular causando exsudação, acelerando o processo adesiogênico<sup>(18)</sup>.

Nos primeiros 3 dias após o dano tecidual há migração de fibroblastos para a área onde ocorreu o dano<sup>(20)</sup>, os fibroblastos das áreas de aderência expressam mais citocinas inflamatórias, que os fibroblastos não oriundos das áreas de aderências, além disso também apresentam apoptose reduzida e maior nitração de proteínas. Os fibroblastos das áreas de adesão compartilham o mesmo comportamento com os fibroblastos expostos à isquemia<sup>(1, 4, 8)</sup>. São exemplos destas citocinas o fator induzível por hipóxia 1 alfa (HIF1- $\alpha$ ), a interleucina 4 (IL-4), a interleucina 6 (IL-6), que regulam a proliferação de células epiteliais e a migração de células inflamatórias para áreas de lesão, a interleucina 10 (IL-10), a ciclo-oxigenase tipo 2 (COX-2), o fator de crescimento transformador beta 1 (TGF- $\beta$ 1), que é um regulador de fibrose, o fator de crescimento transformador beta 2 (TGF- $\beta$ 2), o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que estimulam a formação de colágeno e de novos vasos sanguíneos, e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que regula a atividade de citocinas e pode estimular as

células mesoteliais do peritônio a aumentarem a síntese do inibidor do ativador do plasminogênio 1.

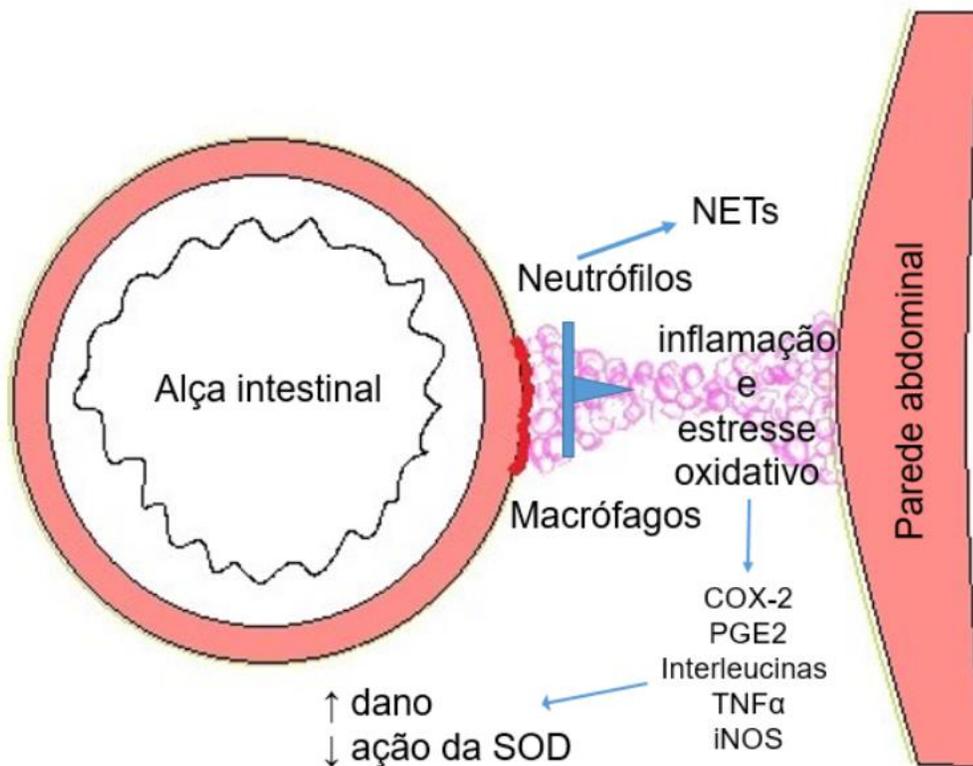
Essas citocinas liberadas pelo processo inflamatório e estresse oxidativo são consideradas o gatilho na formação das aderências peritoneais, levando à deposição de matriz extracelular, seguido de um desequilíbrio na fibrinólise, terminando com a formação das aderências<sup>(8)</sup>. Os fibroblastos inicialmente secretam pré-colágeno, seguido de fibras de colágeno e, por último, fibras elásticas aparecem<sup>(20)</sup>. Com o passar do tempo há a proliferação de vasos neoformados, com o aumento da densidade da aderência e, durante os primeiros 2 anos, a aderência apresenta evolução e mantém-se hipóxica mesmo depois de completamente formada<sup>(3)</sup>.

A reação inflamatória segue-se ao dano peritoneal e diversos mediadores inflamatórios estão envolvidos na formação das aderências. Nas aderências o HIF-1 $\alpha$ , VEGF e a COX-2 estão aumentados quando comparados aos tecidos peritoneais não acometidos por aderências, enquanto a ciclo-oxigenase tipo 1 (COX-1) apresenta-se sem alterações ao comparar os dois tipos de tecido e por isso inibidores seletivos da COX-1 não apresentaram qualquer efeito na formação de aderências, diferente de quando utilizam-se inibidores seletivos de COX-2 há atenuação importante da formação de aderências, apresentando inclusive capacidade de reduzir a produção de Prostaglandina-E2 (PGE2), colágeno tipo 1, de alfa actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), que é um marcador de fibroblasto ativado, de TGF- $\beta$  e fator básico de crescimento do fibroblasto (bFGF), sem alterar os níveis de VEGF, o que leva a conclusão de que os inibidores de COX-2 atuam na formação de aderências inibindo a ativação de fibroblastos e não pela inibição de neoangiogênese<sup>(1, 2, 4, 21, 61)</sup>.

Após estímulo traumático mecânico a COX-2 aumenta no primeiro dia, chegando ao seu nível máximo entre o terceiro e o sétimo dia, sem alteração na concentração da COX-1<sup>(21)</sup>. As prostaglandinas também foram associadas à formação de aderências, visto que foram encontrados níveis elevados de PGE2 em aderências<sup>(21)</sup>. O TGF- $\beta$ 1 ao facilitar o desarranjo entre a deposição e degradação de fibrina é um elo de ligação entre o trauma tecidual e a fibrose, além de poder induzir a deposição de matriz extracelular, que é a base para a formação das aderências<sup>(8)</sup>.

Mediadores inflamatórios como o interferon (IFN), o interferon gama (IFN- $\gamma$ ) o fator de crescimento do hepatócito (HGF) e a relaxina têm o poder de limitar a fibrogênese<sup>(3)</sup>. A IL-10 tem a capacidade de inibir a expressão de IFN- $\gamma$  na maioria das células e em análise laboratorial foi encontrada uma maior concentração de IL-10 e redução do IFN- $\gamma$  ao comparar as aderências com o tecido peritoneal normal.

**Figura 1** – Imagem representativa da manutenção do dano inflamatório e oxidativo induzido pelo processo inflamatório desencadeado pela lesão peritoneal.



**Fonte:** Autoria própria.

#### 1.1.4.2 O papel da isquemia

A isquemia leva à hipóxia tecidual e é um dos fatores que influenciam diretamente na formação das aderências peritoneais. Os fibroblastos que foram expostos à ambientes hipóxicos tiveram aumento significativo da expressão de HIF-1 $\alpha$ , COX-2, PGE2 e VEGF, comportamento similar ao dos fibroblastos em áreas de adesão. Assim como quando ocorre o trauma mecânico, não houve alteração das concentrações da COX-1<sup>(4)</sup>, mas

apresenta redução da expressão de IFN- $\gamma$  com aumento da produção de IL-10<sup>(3)</sup>. Ainda no ambiente hipóxico, a taxa de proliferação dos fibroblastos aumentou quando comparado em situações de normoxia, mas quando foram utilizados inibidores da COX-2, houve inibição da hiperproliferação dos fibroblastos induzida por hipóxia, assim como sua ativação<sup>(4)</sup>. O uso de IFN- $\gamma$  foi capaz de bloquear a apoptose induzida por hipóxia, além de reduzir a produção de colágeno 1 e fibronectina pelos fibroblastos<sup>(1, 3)</sup>. A exposição de fibroblastos normais do peritônio à hipóxia induziu de forma irreversível a expressão de TGF- $\beta$ 1 e colágeno do tipo 1 a níveis similares dos fibroblastos encontrados em áreas de aderência peritoneal<sup>(1, 3, 4)</sup>. Resumindo, a exposição de fibroblastos à hipóxia induz processo inflamatório, com deposição de proteínas da matriz extracelular<sup>(4, 7)</sup>. Conseqüentemente quando em situações de isquemia, assim como quando há o trauma ao mesotélio, há deposição aumentada de fibrina associada a redução da fibrinólise<sup>(62)</sup>. Com a evolução das aderências peritoneais, essas áreas de aderência continuam ser relativamente hipóxicas, e por isso continuam produzindo substâncias pró-oxidantes, como O<sub>2</sub><sup>-</sup> e óxido nítrico (NO), com aumento da expressão de TGF- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$ , IL-6 e VEGF<sup>(1, 3)</sup>.

#### 1.1.4.3 O estresse oxidativo

O dano oxidativo ou “distresse” oxidativo<sup>(63)</sup> é o desequilíbrio entre o excesso da formação de substâncias oxidantes e a incapacidade do organismo em reestabelecer a homeostase através dos antioxidantes<sup>(3, 24, 63)</sup>. Estímulos como o metabolismo celular, inflamação, toxinas, radiações ionizantes, entre outros, geram radicais livres que são substâncias oxidantes. Como exemplo temos o radical hidroxila (OH<sup>-</sup>), o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o O<sub>2</sub><sup>-</sup>, que são espécies reativas de oxigênio (ROS), assim como espécies reativas de nitrogênio como o NO<sup>(1, 3, 27, 63)</sup>.

Os radicais livres têm importante papel na regulação do metabolismo celular fisiológico, mediando funções como proliferação, migração e diferenciação celular, assim como a angiogênese, esse processo fisiológico mediado por radicais livres pode ser referido como “eustresse oxidativo”<sup>(63)</sup>. Quando há o aumento da concentração intracelular de radicais livres como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a célula inicia processos adaptativos de resposta ao estresse até o ponto em que o excesso de radicais livres leva ao dano com

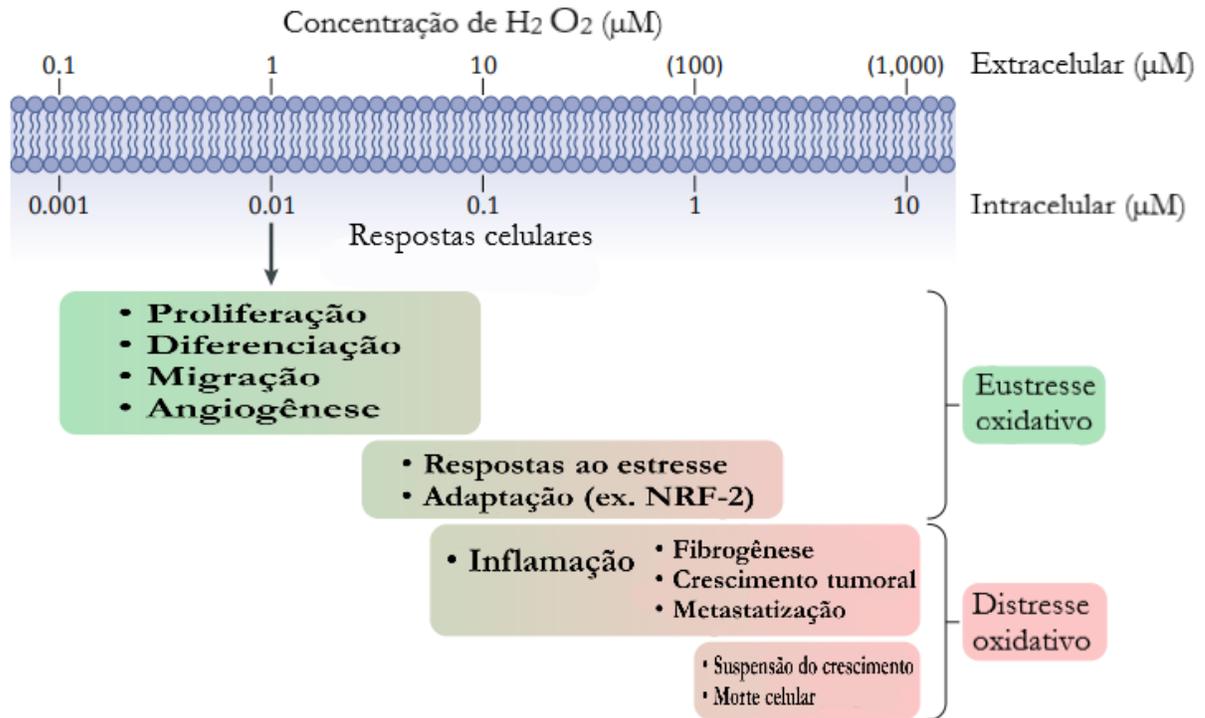
inflamação, fibrogênese, favorecimento do crescimento tumoral e da metastatização culminando com a morte celular. Esse processo danoso pode ser referido como “distresse oxidativo”<sup>(63)</sup>.

Além destes processos os radicais livres em excesso são altamente danoso às funções celulares e às biomoléculas como os ácidos nucleicos, as proteínas e os lipídeos<sup>(3, 24, 27, 63)</sup>. Quando expostos às espécies reativas, as biomoléculas sofrem alterações oxidativas que podem modificar as células e leva-las à morte<sup>(27)</sup>. Foi reportado que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta a produção de MMP-1, COX-2 e PGE2<sup>(3)</sup> e que o peroxinitrito aumenta a produção de TGF-β1 e colágeno tipo 1, que são marcadores fenotípicos de fibroblastos presentes em áreas de aderência<sup>(1, 3)</sup>. O “distresse” oxidativo é relacionado como causador de diversas doenças crônicas como as neurodegenerativas, as cardiovasculares, o diabetes, o câncer e a aterosclerose<sup>(27, 63)</sup>.

Em situações de hipóxia a cadeia respiratória das mitocôndria produz radicais livres, que podem causar lesão da membrana lipídica através de uma reação chamada peroxidação lipídica. Normalmente os radicais livres deveriam ser eliminados pelo sistema de defesa antioxidante, composto pela superóxido desmutase (SOD), glutationala peroxidase, reductase, glutationala e o fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina (NADPH)<sup>(3, 24, 63)</sup>. Em situações de estresse peritoneal como o trauma cirúrgico, inflamação, infecção, doenças degenerativas, autoimunes, câncer e radiação pode haver a produção de radicais livres em excesso que estão associados, além da peroxidação lipídica, ao recrutamento dos neutrófilos e a redução da atividade fibrinolítica propiciando a formação das aderências peritoneais pós-operatórias<sup>(3)</sup>. Associado a isso, ocorre redução da capacidade de neutralizar os radicais livres, acumulando ROS e levando ao desequilíbrio do estresse oxidativo e conseqüentemente a um maior estímulo à formação das aderências peritoneais<sup>(3)</sup>.

Esse processo inflamatório e oxidativo pode ser melhor visualizado, de forma resumida, nas figuras 1 e 2.

**Figura 2** – Imagem representativa da resposta celular à concentração de radicais livres.



Fonte: Adaptado de SIES et al. 2020<sup>(63)</sup>.

O uso experimental da enzima superóxido desmutase foi capaz de reduzir a concentração de radicais livres e consequentemente reduzir a diferenciação do fibroblasto normal no fibroblasto fenotipicamente similar aos presentes nas áreas de aderência, mesmo quando na presença de isquemia, além desta enzima ter apresentado potente propriedade anti-inflamatória, com capacidade de reduzir as aderências pós-cirúrgicas<sup>(3)</sup>.

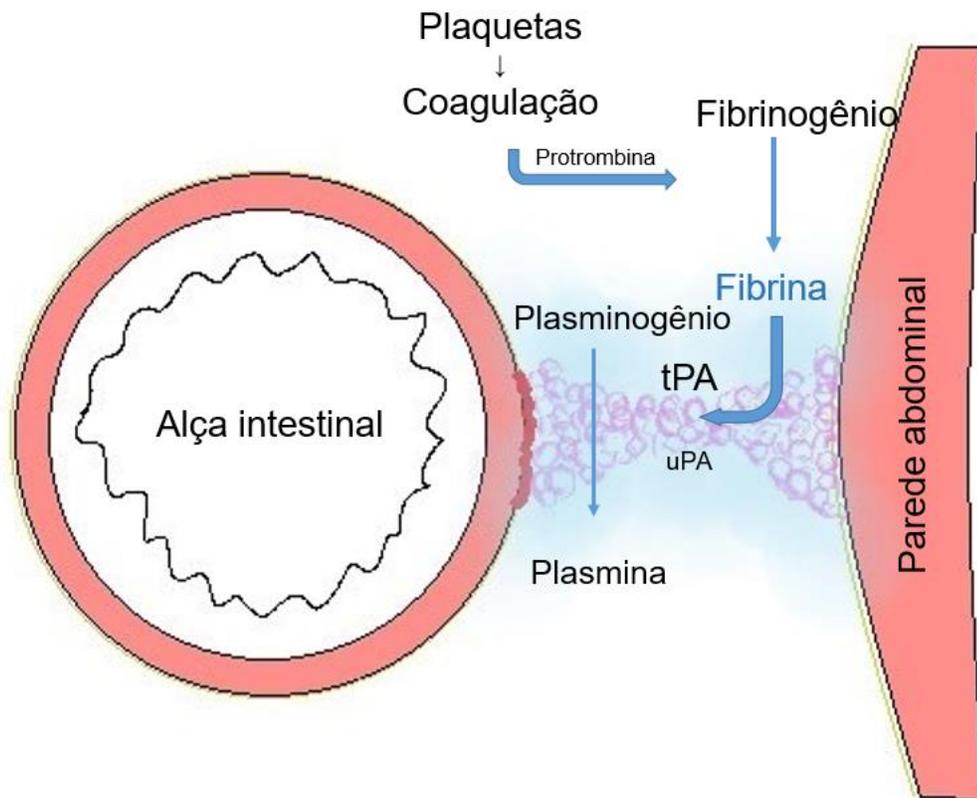
#### 1.1.4.4 O desequilíbrio do ciclo da fibrina na formação da aderência peritoneal

Após o dano peritoneal, seguido do influxo de mediadores inflamatórios como serotonina, bradicinina, histamina e prostaglandinas, ocorre o aumento da permeabilidade vascular e esse extravasamento de plasma sanguíneo, ativa a formação da fibrina que se depositou na área danificada<sup>(2, 6, 7, 10, 13, 20, 64)</sup>. Essa fibrina é decorrente do processo de ativação da cascata de coagulação, com a formação de trombina, levando a ativação de fibrinogênio em fibrina<sup>(2)</sup>.

No processo de cicatrização saudável ocorre a ativação do sistema fibrinolítico, através do ativador tecidual de plasminogênio (tPA), que é o principal ativador do plasminogênio, e do ativador do plasminogênio tipo uroquinase (uPA), que estão presentes nas células endoteliais, mesoteliais e macrófagos. Após a ativação do plasminogênio se segue a degradação da fibrina depositada, processo importante para a completa regeneração mesotelial do peritônio, que ocorre entre 5 e 8 dias em um processo cicatricial livre de aderências<sup>(2, 3, 10, 16, 20)</sup>. Para que o tPA exerça sua ação ativadora ele deve estar ligado a um receptor presente na fibrina, pelo qual tem forte afinidade. Quando não há fibrina para o tPA se ligar ele possui fraca ação ativadora do plasminogênio. Isso explica porque na corrente sanguínea há pouca ativação do plasminogênio, mas no peritônio, é o responsável pela ativação de cerca de 95% do plasminogênio<sup>(2)</sup>. Em se tratando da uPA, sua capacidade de degradação da fibrina é similar à do tPA, porém, por ter menor afinidade de ligação com a fibrina, resulta em menor ativação do plasminogênio, com papel mais importante no remodelamento do que na ativação do plasminogênio<sup>(2)</sup>.

Já no processo de cicatrização peritoneal deficiente, há um desequilíbrio entre a deposição e a degradação da fibrina, com redução da atividade fibrinolítica, por redução da atividade do tPA, por superexpressão do inibidor do ativador de plasminogênio 1 (PAI-1), o mais potente inibidor do tPA, e do inibidor do ativador de plasminogênio 2 (PAI-2), ambos produzidos pelas células endoteliais, mesoteliais, monócitos, macrófagos e fibroblastos, com consequente manutenção da rede de fibrina, que com o tempo se torna mais espessa <sup>(1-4, 6, 7, 11, 13, 16, 20)</sup>.

**Figura 3** – Imagem representativa do processo de deposição e degradação da fibrina na cicatrização do peritônio.



**Fonte:** Autoria própria.

A fibrina pode ser encontrada 10 minutos após o dano mesotelial, com sua concentração máxima após 24 horas. Em 3 a 7 dias a fibrina depositada já deveria ter sido totalmente degradada e, caso isso não ocorra, a aderência peritoneal se forma<sup>(2, 3, 10, 16, 20)</sup>. Essa rede de fibrina é usada para a proliferação e migração dos fibroblastos (transformados em miofibroblastos) que, em áreas de aderência, depositam matriz extracelular contendo colágeno e fibronectina o que permite a organização da rede de fibrina em aderências e quando formadas são pontes de colágeno fibrosas e permanentes com capilares neoformados<sup>(1-3, 5, 7, 10)</sup>. A matriz extracelular poderia ser completamente degradada pelas metaloproteinases da matriz (MMP) levando a uma cicatrização normal e sem a formação de aderências, mas esse processo é inibido pelos inibidores teciduais da MMP<sup>(2, 4)</sup>.

### 1.1.5 Métodos para prevenção da formação de aderências peritoneais

A atenção com possíveis danos peroperatórios passou a ser motivo de preocupação desde o século XIX quando William S. Halsted (1852-1922), descreveu técnicas para reduzir os danos intra-operatórios, os princípios Halstedianos. Tratava-se da manipulação delicada das alças, hemostasia rigorosa, manutenção do suprimento sanguíneo, técnica asséptica, entre outros<sup>(2, 5)</sup>. Outras orientações com o passar do tempo foram incluídas como evitar ressecamento de órgãos intraperitoneais, com a constante umidificação das estruturas, evitar dissecação excessiva ou não realizar o fechamento do peritônio, atentar-se quanto a permanência desnecessária de corpos-estranhos com uso consciente de fios de sutura, boa técnica de sutura, tipo e espessura correta dos fios e sem tensão excessiva, otimizar o uso e o tempo dos drenos de cavidade que quando utilizados deveria ser optado pelos drenos macios e siliconados. Evitar luvas com talco, pois o talco é capaz de induzir aderências pós-operatórias, evitar a presença de coágulos e sangue remanescente na cavidade, além de, quando possível, utilizar técnicas de cirurgia minimamente invasiva<sup>(1, 2, 5, 9)</sup>.

Fios monofilamentares têm menor chance de induzir aderências peritoneais que os fios multifilamentares. Fios mais grossos tem maior chance de causar aderências que os fios mais finos, e fios monofilamentares mais grossos tem menor chance de causar aderência que os multifilamentares mais finos. Ao se comparar os fios absorvíveis com os fios não-absorvíveis, há controvérsia na literatura considerando que, apesar dos fios permanentes poderem manter o estímulo inflamatório quase constante, as aderências são formadas nos primeiros dias e, por isso, não ocorrendo diferença na formação de aderências<sup>(5)</sup>. Foi notado, em experimento animal, que o fio de seda causava aderências peritoneais em ratos<sup>(22)</sup>.

Algumas substâncias tem sido utilizadas no intuito de evitar aderências. Existem substâncias que atuam como barreiras físicas, líquidas ou sólidas, e a utilização de um meio físico tenta evitar que ocorra o contato entre as superfícies<sup>(2)</sup>. Inicialmente tentou-se soluções de dextrana, formando por um gel hipertônico, em diferentes concentrações, mas foi abandonado por complicações graves<sup>(2)</sup>. Hoje usa-se como métodos de barreira o ácido hialurônico (Sepracoat<sup>®</sup>), a icodextrina (Adept<sup>®</sup>), mas os mais comuns são a

celulose oxidada regenerada (Interceed<sup>®</sup>), o politetrafluoroetileno expandido (Preclude Peritoneal Membrane<sup>®</sup>) que é inabsorvível e necessita de um novo procedimento cirúrgico para sua retirada, a carboximetilcelulose (Seprafilm<sup>®</sup>) e o polietilenoglicol (SprayGel<sup>®</sup>). O Seprafilm é absorvido em 7 dias e excretado em 28 dias, mas por poder causar deiscência da anastomose não pode ser utilizado em cirurgias com anastomoses. Esses métodos de barreira foram capazes de reduzir a formação de aderências peritoneais pós-cirúrgicas, sem efeitos adversos graves<sup>(2, 5, 7, 9, 12, 16, 19)</sup>.

O peritônio é capaz de absorver água e eletrólitos por sua superfície de forma rápida em uma taxa de absorção aproximada de 500 ml/dia. Como a regeneração do mesotélio leva de 3 a 8 dias, o uso de soluções cristaloides seria ineficaz para manter as superfícies sem contato até a completa regeneração, além de reduzir a capacidade do peritônio em combater infecções<sup>(3, 5)</sup>.

Algumas outras substâncias apresentaram efeitos inibitórios na formação de aderências, quando utilizadas de forma sistêmica, atuando em diversas fases da formação das aderências como no desequilíbrio entre a formação e degradação da fibrina, no processo de organização da fibrina persistente e na inibição da proliferação dos fibroblastos, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINE), os corticoides, o bloqueador de canal de cálcio, os antagonistas de histamina, os antibióticos, os anticoagulantes, os agentes fibrinolíticos, os antioxidantes, alguns hormônios e vitaminas, a colchicina e imunossupressores<sup>(1-3, 6-9)</sup>.

Os AINE reduzem a produção de prostaglandinas e tromboxano, reduzem a permeabilidade capilar, a agregação plaquetária, a concentração de inibidores de plasmina, além de otimizar a função do macrófago, por isso os AINE e os inibidores seletivos da COX-2 reduziram a incidência de aderências peritoneais pós cirúrgicas em modelo animal experimental de trauma e de isquemia, mas ainda sem evidência desse efeito em humanos<sup>(6, 16, 21, 24)</sup>.

Os corticoides reduzem a permeabilidade capilar, a liberação de citocinas e fatores quimiotáticos, com redução da aderência peritoneal em alguns modelos animais. Mas apresentam efeitos colaterais indesejáveis como imunossupressão e atraso na cicatrização de feridas<sup>(2, 16)</sup>.

O uso de anticoagulantes como a heparina foram capazes de aumentar a fibrinólise, reduzindo aderências, mas sem comprovação em ensaios clínicos<sup>(2)</sup>. O uso de agentes fibrinolíticos como o tPA recombinante quando usados de forma tópica foi capaz de reduzir a formação de aderências, mas com potencial risco de complicações hemorrágicas<sup>(1, 2, 5, 6, 16, 62)</sup>.

O uso de antibióticos quando adotados como profilaxia cirúrgica reduziram a chance de infecção, levando à menor formação de aderências peritoneais, mas quando usados de forma intraperitoneal houve aumento da formação de aderências<sup>(2, 5)</sup>.

A vitamina E é, dentre as vitaminas, a mais estudada para a prevenção de aderências peritoneais, por seus efeitos anti-inflamatório, antioxidante, anticoagulante, antifibroblástico e na redução da produção do colágeno. Por esses efeitos a vitamina E foi capaz de reduzir a aderência peritoneal quando aplicada de forma tópica, no peritônio, mas sem o mesmo efeito se administrado de forma intramuscular, em modelos animais<sup>(2)</sup>.

Anestésicos locais tem algum efeito anti-inflamatório, sendo relatado que são capazes de inibir neutrófilos, tem ação na ativação do sistema fibrinolítico, reduz fator VIII, plasminogênio e reduz a agregação plaquetária, mostrando redução da aderência peritoneal quando aplicado de forma tópica em modelo animal de peritonite bacteriana<sup>(2)</sup>.

A progesterona reduziu a formação de aderências peritoneais em modelo animal, enquanto o estrogênio foi associado a aumento da formação de aderências peritoneais<sup>(5)</sup>.

Algumas substâncias, com o passar do tempo, tem sido utilizadas com alguns efeitos medicamentosos. O mel é utilizado para cicatrização de feridas desde a antiguidade e tem atividade bactericida e bacteriostática, com efeito contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, é antifúngico, antiviral, antitumoral, antimetastático, antioxidante e anti-inflamatório, possui ainda efeito citostático, pró-cicatrizante e estimulador do sistema imune. É composto por inúmeros agentes químicos, como os flavonoides, além de possuir propriedades físicas como pH baixo, hipertonicidade e higroscopicidade, além de ter capacidade comprovada de reduzir a formação de aderências peritoneais pós-cirúrgicas em modelo animal<sup>(12, 15, 64)</sup>. O resveratrol foi capaz de prevenir a formação de aderências peritoneais em ratos, com a inibição da expressão

de citocinas inflamatórias no peritônio lesado e nas aderências, provavelmente por efeito anti-inflamatório<sup>(8, 9)</sup>. O Uso de papaína por via oral foi capaz de reduzir a formação de aderências peritoneais em modelo animal<sup>(10)</sup>. Esses produtos de origem natural são fonte importante para a descoberta de novos tratamentos ou drogas, visto que cerca de 50% das drogas hoje disponíveis vieram de, ou estão relacionados a, alguma substância de origem natural<sup>(27)</sup>.

Como as aderências peritoneais tem sua origem, basicamente, em processos inflamatórios e no estresse oxidativo e, sabendo-se do efeito anti-inflamatório e antioxidante do própolis, surgiu a hipótese de avaliar o efeito do própolis na formação das aderências peritoneais. Inicialmente havia a dificuldade em utilizar o própolis, por ser um produto de origem natural, com seus compostos ativos não homogêneos e de difícil quantificação e replicabilidade. Porém, com a adoção do EPP-AF<sup>®</sup>, existiu a possibilidade de saber a quantidade de cada composto ativo no própolis administrado aos ratos, atingindo confiabilidade e reprodutibilidade sem similar na literatura pesquisada. O própolis por ser considerado um produto nutracêutico, de origem natural, que pode ser associado a maior parte dos regimes dietéticos, sem contraindicações conhecidas e podendo ser utilizado inclusive por portadores de doenças crônicas e terminais, possibilitaria o uso futuro em estudo com humanos. Ao se pesquisar o efeito do própolis nas aderências peritoneais, por não se tratar de um medicamento e sem todas as possíveis implicações que o uso de um medicamento pode causar, poderia simplesmente ser adicionado à dieta como suplementação alimentar.

#### 1.1.6 O própolis

Própolis é um substantivo de dois números e dois gêneros<sup>(65)</sup>, não variando entre o plural e o singular e podendo ser usado tanto no masculino quanto no feminino, sendo referido por muitos como a própolis e é um produto produzido pelas abelhas para proteção da sua colônia. Sua origem etimológica vem do grego *pro-* para ou em defesa de e *polis-* cidade, então literalmente significa defensor da cidade ou em prol da cidade, já que as abelhas utilizam o própolis para defender a colmeia de micro-organismos ou invasores, para reparar danos, como isolante térmico e para manter áreas da colmeia assépticas, protegendo as larvas de infecções microbianas, sendo uma das principais

substâncias de defesa das abelhas<sup>(27, 29)</sup>. O própolis é um produto natural resinoso, lipofílico, duro e quebradiço quando resfriado, mas macio e pegajoso quando aquecido, com aroma agradável e de diferentes colorações, obtidas ao misturar seiva de plantas (o que faz mudar a coloração da resina) com enzimas salivares e cera de abelha<sup>(27, 29)</sup>. A composição do própolis varia dependendo da planta fonte usada, por isso é difícil de ser padronizada, dependendo de inúmeras condições como a flora local, o clima, o local de coleta e a espécie de abelha. Em termos de composição química, geralmente é composto de 50% resina, 30% cera de abelha, 10% óleos essenciais, 5% pólen e 5% de outras substâncias como minerais e compostos orgânicos que compreendem flavonoides, ácidos fenólicos, ésteres, terpenos, etc. <sup>(25, 27, 29)</sup>

Entre os minerais presentes no própolis encontramos iodo, cálcio, magnésio, sódio, potássio, cobre, zinco, ferro e manganês, vitaminas A, B (B1, B2, B6), C, D e E, ácidos graxos, enzimas salivares das abelhas e possivelmente do pólen, amido, glicose, frutose, ribose, ramnose, talose, gulose e sacarose<sup>(27)</sup>.

O própolis é utilizado pela humanidade desde a antiguidade, sendo usado, pelo menos, desde o ano 300 a.c., na medicina popular ou para preservação de alimentos<sup>(1, 27, 30)</sup>. Os egípcios aprenderam com as abelhas a propriedade de embalsamamento do própolis que passou a ser utilizado na mumificação e para prevenir a propagação de infecções. Os gregos e os romanos conheciam as propriedades antissépticas e cicatrizantes além de ser usado como desinfetante bucal. Os persas descreveram o própolis como droga capaz de tratar eczemas, mialgia e reumatismo. Povos do novo mundo como os incas utilizavam o própolis como antipirético. No século XVII o italiano Antonio Stradivari usava o própolis como um dos ingredientes do verniz de seus instrumentos musicais e até hoje o própolis é usado na resina de instrumentos de corda e no reparo de acordeões. Na União Soviética o uso do própolis era aceito em humanos e na medicina veterinária, sendo usado contra tuberculose, além de uso na medicina popular Georgiana. Na Segunda Guerra Mundial era usada para tratamento de feridas<sup>(27)</sup>.

Apesar de seu uso através do tempo e de sua segurança, já que não há relatos de efeitos colaterais, tóxicos ou mutagênicos no uso em mamíferos <sup>(27-29)</sup>, não é considerado hoje como medicamento na medicina convencional, por não haver completa

identificação dos componentes químicos e de sua atividade biológica, além de existirem diferentes tipos de própolis no mundo. A padronização dos componentes do própolis seria indispensável para que fosse aceito pelo sistema de saúde como medicamento<sup>(27)</sup>.

O própolis tem um ampla gama de efeitos biológicos, como os efeitos antimicrobiano, anti-inflamatório, antioxidante, antitumoral, cicatrizante, reduz a permeabilidade capilar, a neoangiogênese e a fibrose, é estimulador do sistema imune, anestésico local e hepatoprotetor, esses efeitos são atribuídos aos polifenóis presentes em sua composição. Além disso aumenta a função cognitiva, reduzindo a deposição de proteínas no cérebro mediado pelo aumento da homocisteína<sup>(1, 23-25, 27-30)</sup>. Foi relatado que tanto o própolis como o pólen e seus compostos químicos tem ação antioxidante<sup>(15)</sup>. Entre esses efeitos já descritos do própolis notou-se redução do colesterol total e o aumento da lipoproteína de alta densidade (HDL) em ratos com doença aterosclerótica. Foi capaz de reduzir os efeitos da colite induzida em ratos, levou ao *upregulation* da apolipoproteína A1 (principal componente proteico do HDL) e, com esses achados, apresenta provável potencial de proteção cardiovascular. Causou redução da glicemia em ratos, protegeu contra inflamação induzida por hipóxia na micróglia, pôde reverter a disfunção sináptica induzida por neuroinflamação e melhorou o prognóstico em várias doenças crônicas<sup>(25, 26)</sup>.

#### 1.1.5.1 O efeito antioxidante do própolis

O principal efeito antioxidante dos polifenóis vem da capacidade de neutralizar as espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio e reduzir a reação da xantina oxidase<sup>(25)</sup>. Os polifenóis do própolis possuem potente efeito antioxidante e esta capacidade varia conforme a região em que foi produzido pelas abelhas. O efeito antioxidante se dá pela inibição de algumas enzimas como a xantina oxidase, proteína quinase C, ácido ascórbico oxidase, ciclo-oxigenase, lipoxigenase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase, e cAMP fosfodiesterase, inibindo a produção de ROS, quelando íons metálicos que estão envolvidos na produção de radicais livres, ou potencializando a ação de outros antioxidantes<sup>(27)</sup>, além disso o própolis foi capaz de reduzir a produção de NO pelos macrófagos<sup>(1, 29)</sup>. O éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE) foi capaz de aumentar a atividade da SOD e da glutathiona peroxidase, além de inibir a transcrição do NF-κB e

reduzir a concentração de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-6. Com essas informações é provável que, pelo menos em parte, o efeito anti-inflamatório do própolis tenha relação com a inibição da produção de NO pelos macrófagos<sup>(1)</sup>.

#### 1.1.5.2 O efeito anti-inflamatório da própolis

A inflamação é uma resposta normal à estímulos danosos, porém quando ocorre de forma exacerbada pode induzir alguns estados patológicos como asma, câncer, aterosclerose, doenças de Alzheimer e de Parkinson<sup>(27)</sup>. O efeito anti-inflamatório dos flavonoides foi capaz de reduzir a expressão de IL-6, PGE2, TNF-  $\alpha$  e interleucina 13 (IL-13), VEGF, TGF- $\beta$ 1 e colágeno, além de inibir a ativação do NF- $\kappa$ B<sup>(1, 27, 28)</sup>. Compostos do própolis como o ácido cafeico, quercetina, naringina, o CAPE, entre outros, tem a capacidade de inibir a produção de eicosanoides e suprimem a cascata do ácido araquidônico, sendo o CAPE o mais potente modulador, que foi capaz de melhorar a esteatose hepática em ratos, reduzindo também TNF-  $\alpha$ , IL-1 e outras citocinas pró-inflamatórias, como COX-2 e PGE2<sup>(1, 27, 29)</sup>. Além do efeito anti-inflamatório o própolis possui atividade imunomoduladora podendo, por exemplo, ser utilizado no tratamento da asma e outras doenças alérgicas<sup>(27)</sup>.

#### 1.1.5.3 O efeito antimicrobiano do própolis

Macrófagos incubados com própolis tiveram maior capacidade de fagocitar e matar leishmanias *in vitro*<sup>(27)</sup>. Houve também efeito contra o *T. cruzi*, levando à morte do protozoário, provavelmente por alteração da permeabilidade da membrana<sup>(29)</sup>.

Os compostos do própolis mostraram capacidade de combater o vírus herpes simples tipo 1, vírus coxsackie B3, B4 e A9, e echovirus 30. Notou-se ainda a capacidade de reduzir a atividade do vírus da imunodeficiência humana (HIV), provavelmente por inibir a entrada do vírus na célula<sup>(27)</sup>.

O própolis também mostrou eficácia contra bactérias, porém com maior eficácia contra as bactérias Gram-positivas, sendo capaz de inibir a motilidade e atividade enzimática das bactérias, com efeito bacteriostático e que, em altas concentrações, se torna bactericida. Foi relatado o aumento drástico do efeito da ampicilina, gentamicina e estreptomicina, com efeito sinérgico entre o própolis e esses antibióticos, além de eficácia

direta contra o *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA) e o *Staphylococcus aureus* sensível a metilina (MSSA)<sup>(27, 29, 30)</sup>.

O própolis mostrou grande eficácia contra a espécie *Cândida*, sem induzir resistência, inclusive contra algumas cepas resistentes a antifúngicos, mostrando um grande potencial para o tratamento contra candidíase vulvovaginal<sup>(27)</sup>.

#### 1.1.5.4 O efeito antitumoral do própolis

O própolis pôde bloquear as cascatas de sinalização de alguns oncogenes, com decorrente redução da proliferação celular e crescimento tumoral, além da indução de apoptose, redução da neoangiogênese e modulação do microambiente tumoral<sup>(27)</sup>. Em testes *in vitro* o própolis teve efeito antiproliferativo em linhagens celulares tumorais, mas não contra células normais, mostrando efeitos contra as células do melanoma, do câncer colorretal, do câncer prostático, com grande redução da proliferação celular. Contra a célula do câncer mamário também houve ação dose-dependente, além de apresentar toxicidade seletiva às células do câncer renal em comparação com células renais normais<sup>(27)</sup>. Em ratos com câncer gástrico induzido experimentalmente, o tratamento com própolis reduziu a incidência tumoral, o número de lesões e anormalidades estruturais microscópicas do tumor quando comparados com o controle, além de reduzir o número de mitoses e levar a mudanças que poderiam induzir à necrose celular<sup>(27)</sup>. O CAPE foi capaz de suprimir a adesão e invasão do carcinoma hepatocelular<sup>(27)</sup>.

#### 1.1.5.5 O própolis verde

O própolis verde brasileiro utiliza predominantemente o extrato da planta *Baccharis dracunculifolia*, chamado de alecrim do campo ou vassourinha. A própria *Baccharis spp.* tem propriedades antirreumática, antifúngica, e inseticida. A *B. dracunculifolia* possui ação protetora contra úlceras gástricas reduzindo o volume da secreção gástrica com aumento do seu pH. Muitas das substâncias presentes nesta planta foram encontradas no própolis verde e apesar do claro efeito antioxidante do própolis verde, não foi comprovado esse efeito no extrato da *B. dracunculifolia*<sup>(24, 30)</sup>.

A criação do extrato padronizado de própolis (EPP-AF<sup>®</sup>) permitiu a utilização do extrato solúvel de própolis verde como droga pois notou-se que, ao comparar 3 parcelas

diferentes deste própolis, as concentrações e a presença dos compostos pesquisados (ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido trans-cinâmico, aromadendrina, isosakuranetina e artepelin C) eram similares, permitindo que seu uso fornecesse sempre a mesma proporção de compostos com este extrato de própolis<sup>(29)</sup>.

#### 1.1.6 Os métodos de criação e de avaliação das aderências na cirurgia experimental

Existem inúmeros modelos animais desenvolvidos para a indução de aderências peritoneais pós-cirúrgicas<sup>(1, 4, 6-8, 10-14, 17-19, 21, 22, 61, 62, 64, 66-69)</sup>. Essa grande variabilidade pode ser um dos fatores que dificultam no estabelecimento de um tratamento definitivo para as aderências, associado a falta de um escore objetivo para classificação e comparação das aderências<sup>(4,19)</sup>. Apesar da ampla variedade de escores utilizados para avaliação das aderências, todos esses métodos são semiquantitativos, pois não avalia todas alterações encontradas na cavidade peritoneal, graduando a considerada mais intensa e apresentando pontuação limitada<sup>(1, 4, 6-14, 17, 19, 20, 62, 64, 67)</sup>.

### 1.2 Justificativa

É necessária a existência de um modelo animal que induza a formação de aderências peritoneais em todos os animais e que as aderências formadas apresentem padrão similar para que os resultados possam ser comparados. Além do modelo animal é necessária a existência de um método de avaliação macroscópica das aderências, em que todas as alterações possam ser avaliadas, quantificadas e classificadas, trazendo sistematização e permitindo a comparação dos resultados inclusive entre trabalhos distintos.

Aliado a métodos mais eficazes de indução e classificação das aderências peritoneais pós-cirúrgicas, o estudo de novas substâncias com potencial de impactar na formação das aderências, prevenindo ou reduzindo a formação de aderências peritoneais é de grande interesse científico, atual e necessário.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito da administração do extrato aquoso de própolis verde, na formação de aderências peritoneais, em ratos submetidos ao modelo animal de gastrotomia seguida de gastrorragia.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Criação, caracterização e validação do novo modelo animal de gastrotomia seguida de gastrorragia como um modelo eficiente na formação de aderências peritoneais.

Criação, caracterização e validação de um novo método quantificável de classificação macroscópica das aderências peritoneais.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Aprovação da CEUA

Projeto aprovado, sob o protocolo de número 104/17, pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87.

#### 3.2 Seleção dos animais e cuidados perioperatórios

##### 3.2.1 Cuidados pré-operatórios

Foram utilizados no total cinquenta e três ratos (14 animais utilizados para o projeto piloto) da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*), adultos, machos, com peso corporal de 300g ( $\pm$  80g), alocados aleatoriamente nos grupos, através de sorteio. Os ratos foram provenientes e mantidos no biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), em ambiente controlado com temperatura de 22°C ( $\pm$  2°C), ciclo claro/escuro de doze horas, recebendo água e ração balanceada *ad libitum*, sem jejum pré-operatório.

O bem estar animal foi monitorizado e avaliado conforme a Resolução Normativa nº 25 do CONCEA<sup>(70)</sup>, assim como o cálculo do tamanho amostral, que foi obtido através da equação de recursos<sup>(70)</sup>. Dois cálculos de tamanho amostral foram realizados para o experimento, o primeiro foi na criação do novo modelo animal de indução de aderências peritoneais e o segundo cálculo amostral foi para a pesquisa com o própolis. Para homogeneização do tamanho das amostras optou-se por utilizar o maior valor encontrado. Pelo cálculo era necessário que cada grupo tivesse entre 4 e 8 animais, sendo adotado o número de 6 animais por grupo, a média entre os resultados.

##### 3.2.2 Anestesia

Os animais foram submetidos à anestesia geral intraperitoneal com cetamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg) através de punção no quadrante inferior direito do abdome com agulha 13 x 0,45 milímetros. Para minimizar o risco de punção inadvertida

de alças intestinais, a introdução da agulha e infiltração do anestésico foram realizadas com os animais em posição de cefalodeclive. Após a anestesia foi realizada a tricotomia e a antissepsia da parede abdominal com solução aquosa de Iodopovidona, para então iniciar os procedimentos cirúrgicos, que foram realizados no Laboratório de Cirurgia Experimental da UFRJ.

### 3.2.3 Cuidados intra-operatórios

Todas as operações foram realizadas pelo mesmo cirurgião, através de uma laparotomia mediana de cerca de 5,0 cm. Todos os fechamentos da parede abdominal foram realizados da mesma maneira, com fio polipropileno 5.0 em sutura contínua e em dois planos, a saber: camada músculo-aponeurótica e pele.

Nos animais submetidos ao novo modelo de indução de aderências peritoneais (gastrotomia seguida de gastrorragia – subitem 2.3 e anexo 1), após o estômago ter sido gentilmente exteriorizado, foi realizada uma incisão longitudinal de cerca de 1,0 cm na parede anterior do antro/corpo gástrico, seguida de fechamento imediato com sutura contínua de fio polipropileno 5.0. A exteriorização não intencional de segmentos da mucosa gástrica através da linha de sutura foi permitida. Quando, durante a gastrotomia, ocorreu extravasamento de conteúdo gástrico, esta secreção foi imediatamente removida com gazes estéreis, evitando a disseminação da secreção gástrica para a cavidade peritoneal.

### 3.2.4 Cuidados pós-operatórios

Os animais foram mantidos em gaiolas com dois a três animais, sempre pertencentes ao mesmo grupo. A dieta oral foi iniciada entre doze e dezoito horas após o procedimento cirúrgico, com água e ração *ad libitum*. À água de bebida foi acrescentado ibuprofeno, para analgesia, na concentração de 0,2 mg/ml, por três dias, sendo monitorizado o volume de água ingerido.

### 3.2.5 Eutanásia e necropsia

A eutanásia e a necropsia foram realizadas no 14º dia de pós-operatório por overdose farmacológica de cetamina (300mg/kg) e xilazina (30mg/kg) através de punção

no quadrante inferior direito do abdome, com agulha 13 x 0,45 milímetros, após os animais terem sido posicionados em cefalodeclive. Após a parada cardiorrespiratória foi realizada incisão abdominal em forma de “U”. Esse formato de incisão foi adotado para minimizar a possibilidade de danos às aderências peritoneais que pudessem ser encontradas na cavidade peritoneal. As cavidades abdominais foram fotografadas com a câmera do celular Samsung® S9 Plus, para posterior avaliação macroscópica das aderências. Foram ressecados em bloco as estruturas que apresentavam aderências peritoneais e, mesmo na ausência de aderências, o estômago, o epíplon o fígado, o baço e a parede abdominal, sendo posteriormente fixadas em solução de formaldeído a 10% e seguido o procedimento histológico pormenorizado no subitem 3.2.6.

### 3.2.6 Histologia

Após a fixação das peças anatômicas em formaldeído, estas foram clivadas e inseridas em cassetes histológicos pelo próprio aluno e enviadas para processamento histológico. Os blocos foram cortados em micrótomo rotatório e os cortes fixados em lâminas histológicas, para serem corados com Hematoxilina-Eosina (HE) e com Picrosirius Red (PR) e analisados no microscópio de luz e polarização E 800 Nikon® (Japan) do laboratório de Imunopatologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. Os cortes histológicos prontos foram escaneados com o scanner de lâminas Leica® Aperio CS2 (Germany), do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Naval Marcílio Dias.

O processamento histológico foi realizado no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Naval Marcílio Dias e a preparação da lâmina corada pelo Picrosirius Red, no Laboratório de Imunopatologia do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ.

A microscopia e a avaliação histológica foram utilizadas para que somente as aderências formadas por tecido cicatricial, composto por colágeno, células inflamatórias e vasos neoformados fossem analisadas macroscopicamente. As bandas de fibrinas ligando as superfícies viscerais, sem a formação da aderência com tecido cicatricial não foram consideradas como aderências e portanto não foram analisadas. Não houve análise microscópica para quantificar, qualificar ou graduar as aderências.

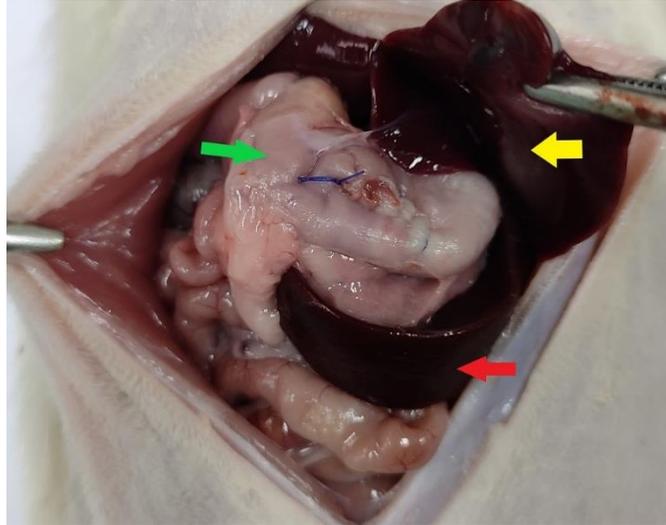
### 3.3 Projeto piloto e desenvolvimento do modelo de Gastrotomia seguida de Gastrorrafia

Dois ratos foram utilizados para avaliação da abrasão cecal<sup>(13, 14, 17, 19)</sup> e da eletrocauterização com sutura do peritônio<sup>(67)</sup> como modelo de indução de aderência peritoneal. A abrasão cecal foi realizada com gaze seca até o aparecimento de petéquias na superfície do ceco, associada à eletrocauterização do peritônio parietal contralateral, no quadrante inferior esquerdo, seguida de sobressutura da área cauterizada com fio poliglactina 4.0 em sutura contínua. A eutanásia foi programada para o sétimo dia de pós-operatório.

Seis ratos foram utilizados para avaliar a gastroenteroanastomose<sup>(66)</sup> como modelo de indução de aderência peritoneal. O procedimento consistia em realizar uma incisão longitudinal de cerca de 1 cm no antro/corpo gástrico e em borda antimesentérica de alça de intestino delgado, a cerca de 8 cm do ângulo de Treitz, seguida da realização da anastomose com fio polipropileno 5.0 em sutura contínua e em plano único. Após o término da anastomose, era ratificada a integridade da sutura e sua perveidade da anastomose através da palpação do pertuito. A eutanásia foi programada para o sétimo dia de pós-operatório.

Para o desenvolvimento do novo modelo animal de aderência peritoneal foram utilizados seis ratos. O procedimento consistia na realização de uma laparotomia mediana de cerca de 5 cm, com exteriorização do estômago, seguida da realização de incisão longitudinal na parede anterior do antro/corpo gástrico, de cerca de 1 cm e fechamento imediato da gastrotomia, utilizando fio polipropileno 5.0 em sutura contínua (figura 4). Durante o procedimento cirúrgico foram tomadas todas as medidas para impedir a contaminação da cavidade peritoneal com o conteúdo gástrico e caso houvesse o extravasamento de conteúdo gástrico durante a gastrotomia, esta secreção seria imediatamente removida com gazes estéreis, evitando assim sua disseminação para a cavidade peritoneal. A eutanásia foi programada para o sétimo dia de pós-operatório.

**Figura 4** - Modelo de gastrotomia seguido de gastrorrafia. Fígado seta amarela, estômago após gastrotomia e gastrorrafia seta verde, baço seta vermelha.

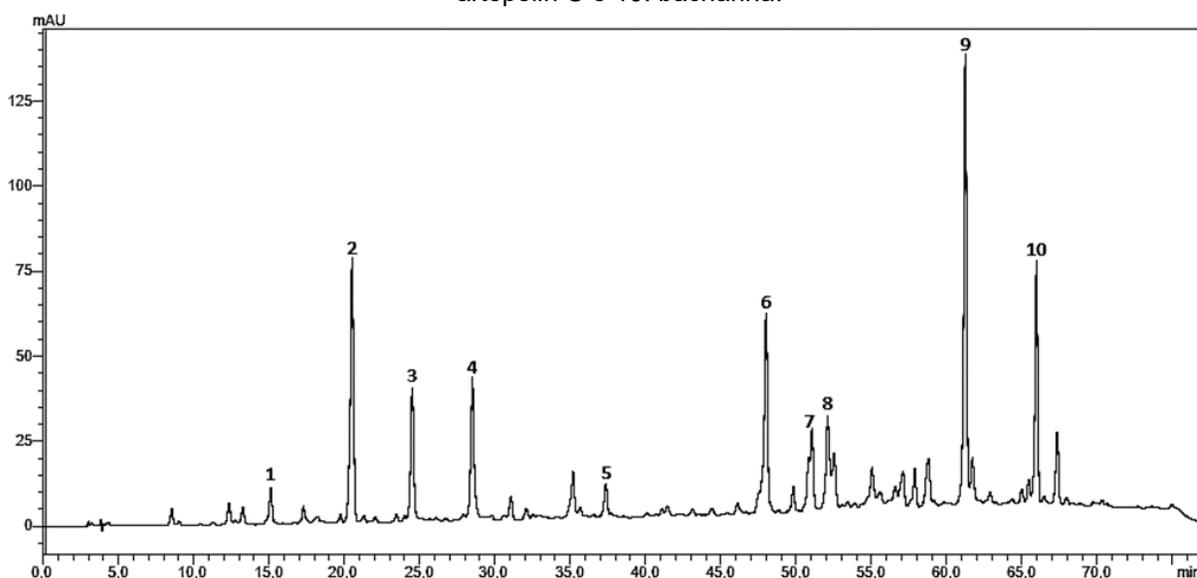


**Fonte:** Autoria própria.

### 3.4 Própolis

Para a pesquisa foi utilizado o extrato seco de própolis gentilmente cedido pela Apis Flora<sup>®</sup>, Ribeirão Preto - SP, Brasil. Este extrato fornecido tinha a apresentação de extrato seco solúvel, para que pudesse ser diluído imediatamente antes do seu uso, garantindo a estabilidade dos componentes e a maior homogeneidade na concentração e eficácia dos compostos químicos, mesmo quando administrado em momentos distintos da pesquisa. A figura 5, apresenta o perfil cromatográfico obtido para o extrato utilizado. Os resultados da análise do extrato de própolis utilizado na pesquisa demonstram o mesmo perfil químico característico do própolis verde EPP-AF<sup>®</sup>.

**Figura 5-** Perfil cromatográfico obtido por HPLC/DAD; 1: ácido cafeico; 2: ácido p-cumárico; 3: Ácido 3,5-dicafeoilquínico; 4: Ácido 4,5-dicafeoilquínico; 5: aromadendrina; 6: drupanina; 7: crisina; 8: galangina; 9: artepelin C e 10: bacharina.



Fonte: Apis Flora®.

### 3.5 Grupos da pesquisa

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos. Cada grupo recebeu, por sorteio, seis ratos e caso ocorresse algum óbito, este animal seria substituído por um novo, selecionado da mesma forma, obtendo-se ao final da pesquisa seis animais por grupo. Todos os animais foram operados pelo mesmo cirurgião, que realizou também os procedimentos anestésicos, a diluição e administração do própolis, a eutanásia e a ressecção das peças cirúrgicas durante a necropsia.

#### 3.5.1 Grupo controle

Os animais foram expostos ao mesmo ambiente que os ratos pertencentes aos outros grupos (biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da UFRJ), durante todo o período da pesquisa. Neste grupo nenhum procedimento cirúrgico foi realizado e estes animais foram utilizados para que se obtivesse o parâmetro anatômico normal. Após serem submetidos à eutanásia foi ressecado o estômago, o fígado, o epíplon, o baço e a parede abdominal e as peças enviadas para histopatologia.

### 3.5.2 Grupo simulação (Sham)

Os animais foram submetidos à laparotomia mediana, seguida de manipulação delicada do fígado, do estômago e do epíplon, e a cavidade abdominal foi mantida aberta por vinte minutos, o tempo médio necessário para a realização da gastrotomia seguida de gastrorrafia, seguido de fechamento da parede abdominal. Após serem submetidos à eutanásia foram ressecadas as aderências encontradas, o estômago, o fígado, o epíplon, o baço e a parede abdominal. As peças foram enviadas para histopatologia.

### 3.5.3 Grupo cirurgia (gastrotomia seguida de gastrorrafia)

Os animais foram submetidos a laparotomia mediana, seguida do procedimento preconizado no modelo animal de gastrotomia seguida de gastrorrafia. Após serem submetidos à eutanásia foram ressecadas as aderências encontradas, o estômago, o fígado, o epíplon, o baço e a parede abdominal. As peças foram enviadas para histopatologia.

### 3.5.4 Grupo própolis tópico

Os animais foram submetidos a laparotomia mediana, seguida do procedimento preconizado no modelo animal de gastrotomia seguida de gastrorrafia. Antes do fechamento da parede abdominal foi infundida na cavidade peritoneal a solução de própolis verde Apis Flora<sup>®</sup>, na dosagem 300mg/kg de peso, em dose única, diluído em 3 ml de solução salina 0,9%, de forma intraperitoneal. Cada animal recebeu aproximadamente as dosagens de 4,29 mg de 3,5-DCQ e 5,51 mg de 4,5-DCQ, 0,417 mg e 1,91 mg de crisina e galangina, respectivamente, 5,20 mg, 18,09 mg e 2,55 mg de drupanina, artepelin C e bacharina, respectivamente e 13,0 mg de quercetina por cada quilo de peso.

Após serem submetidos à eutanásia foram ressecadas as aderências encontradas, o estômago, o fígado, o epíplon, o baço e a parede abdominal. As peças foram enviadas para histopatologia.

### 3.5.5 Grupo própolis enteral na dosagem 100mg/kg/dia

Os animais foram submetidos a laparotomia mediana, seguida do procedimento

preconizado no modelo animal de gastrotomia seguida de gastrorrafia. Diariamente foi infundida por gavagem a diluição de própolis verde Apis Flora<sup>®</sup>, na dosagem 100mg/kg de peso, desde o primeiro dia de pós operatório, até o décimo-terceiro dia de pós operatório. Cada animal recebeu aproximadamente as dosagens de 1,429 mg de 3,5-DCQ, 1,836 mg de 4,5-DCQ, 0,139 mg e 0,635 mg dos flavonoides crisina e galangina, respectivamente, 1,734 mg, 6,03 mg e 0,850 mg dos compostos prenilados drupanina, artepelin C e bacharina, respectivamente e 4,33 de quercetina por cada quilo de peso por dia.

Após serem submetidos à eutanásia foram ressecadas as aderências encontradas, o estômago, o fígado, o epíplon, o baço e a parede abdominal. As peças foram enviadas para histopatologia.

#### 3.5.6 Grupo própolis enteral na dosagem 300mg/kg/dia

Os animais foram submetidos a laparotomia mediana, seguida do procedimento preconizado no modelo animal de gastrotomia seguida de gastrorrafia. Diariamente foi infundido por gavagem a diluição de própolis verde Apis Flora<sup>®</sup>, na dosagem 300mg/kg de peso, desde o primeiro dia de pós operatório, até o décimo-terceiro dia de pós operatório. Cada animal recebeu aproximadamente as dosagens de 4,29 mg de 3,5-DCQ e 5,51 mg de 4,5-DCQ, 0,417 mg e 1,91 mg de crisina e galangina, respectivamente, 5,20 mg, 18,09 mg e 2,55 mg de drupanina, artepelin C e bacharina, respectivamente e 13,0 mg de quercetina por cada quilo de peso por dia.

Após serem submetidos à eutanásia foram ressecadas as aderências encontradas, o estômago, o fígado, o epíplon, o baço e a parede abdominal. As peças foram enviadas para histopatologia.

### **3.6 Modelos macroscópicos de avaliação das aderências**

Para a avaliação macroscópica das aderências foram utilizadas as escalas segundo Evans et al.<sup>(62)</sup> e segundo Nair et al.<sup>(10)</sup>, descritas nas tabelas 1 e 2, respectivamente. Além dessas escalas, foi desenvolvida uma nova escala que permitia a análise das aderências de forma quantificável.

**Tabela 1** – Graduação de aderências peritoneais segundo Evans et al.<sup>(62)</sup>

<b>Graduação</b>	<b>Descrição das aderências</b>
<b>0</b>	Ausência de aderências
<b>1</b>	Aderências membranosas que se separam espontaneamente
<b>2</b>	Aderências firmes que se separam por tração
<b>3</b>	Aderências densas que necessitam dissecação cortante para sua separação

**Fonte:** Modificado de Evans et al.<sup>(62)</sup> (1993).

**Tabela 2** – Graduação de aderências peritoneais segundo Nair et al.<sup>(10)</sup>

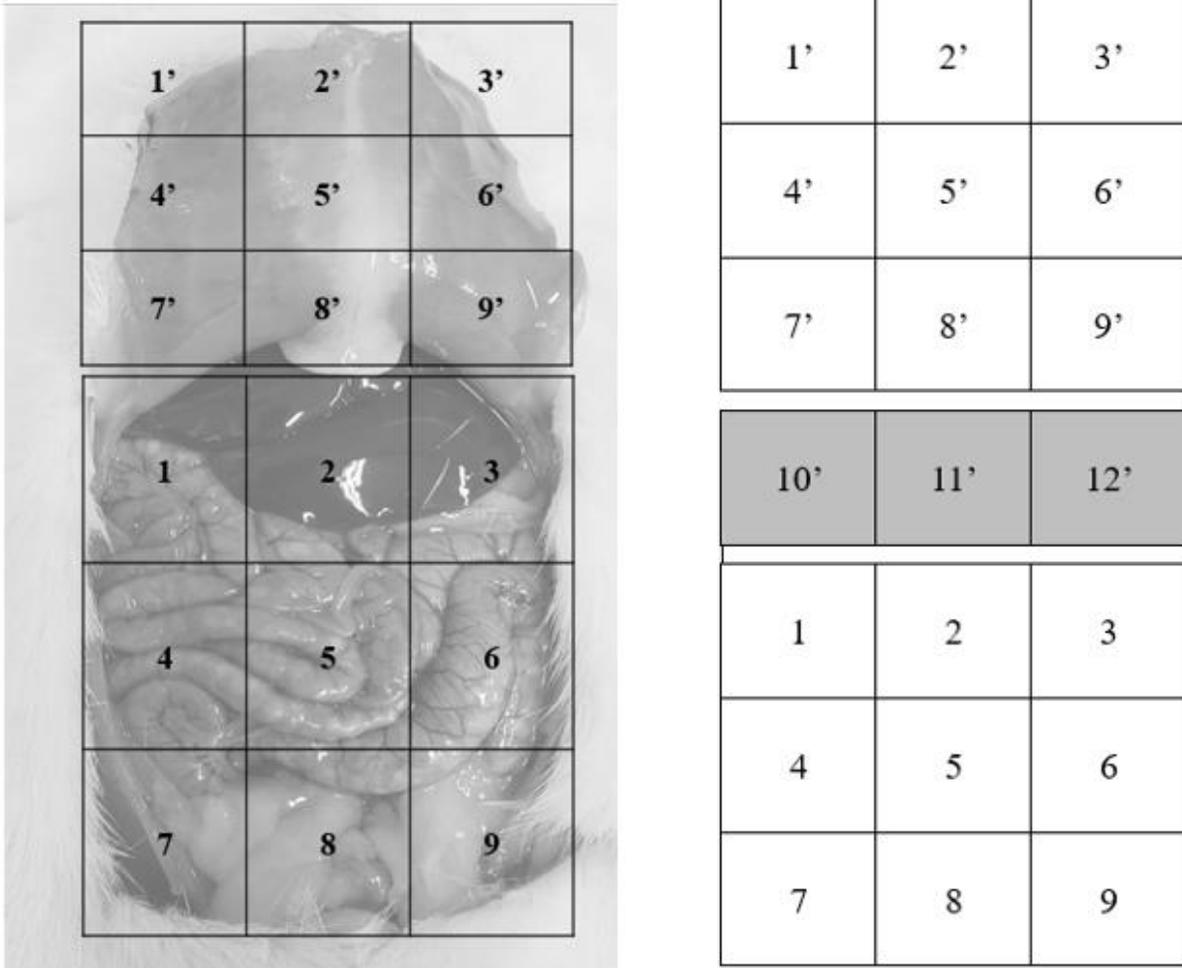
<b>Graduação</b>	<b>Descrição das aderências</b>	
<b>0</b>	Ausência completa de aderências	Aderências pouco substanciais
<b>1</b>	Banda única de aderência, entre vísceras ou entre víscera e parede abdominal	
<b>2</b>	Duas bandas de aderência, entre vísceras ou entre víscera e parede abdominal	Aderências substanciais
<b>3</b>	Mais de duas bandas de aderência, entre vísceras, entre víscera e parede abdominal, ou massa de aderência acometendo todas as alças intestinais sem acometer à parede abdominal	
<b>4</b>	Víscera aderindo diretamente a parede abdominal independentemente do número ou extensão das aderências	

**Fonte:** Modificado de Nair et al.<sup>(10)</sup> (1974).

A nova proposta para quantificação de aderências baseia-se na divisão do abdome em vinte e um quadrantes, sendo nove na parede abdominal, três no diafragma e mais nove na cavidade abdominal (figura 6). Para efeito de simplificação não foi separada a região peritoneal da região retroperitoneal, sendo avaliado o quadrante abdominal como um todo. Em cada quadrante avalia-se as aderências com seus agravantes (tabela 3) e, além disso, avalia-se também o aspecto do quadrante independente de ele estar ou não acometido por aderências, bastando que apresentem alterações em relação ao aspecto anatômico normal. Caso o quadrante seja acometido por mais de uma aderência, a cada uma das aderências será atribuída uma pontuação referente a sua extensão e aspecto.

Após a atribuição de valor, soma-se as graduações de todas as aderências peritoneais encontradas neste setor com a pontuação das alterações encontradas, obtendo-se o valor total do quadrante. Todos os quadrantes serão somados para chegar ao resultado da pontuação total do animal. Não há limite de pontuação neste método.

**Figura 6** – Divisão da parede abdominal com a cavidade abdominal em 21 quadrantes, sendo 9 quadrantes na parede, 3 quadrantes em cúpula diafragmática (direita, central e esquerda), e 9 quadrantes na cavidade abdominal.



Fonte: Autoria própria.

Após a avaliação individualizada de cada um dos quadrantes, é aplicada à cada um deles uma análise qualitativa e quantitativa das aderências e das alterações encontradas, que poderiam ser quantificadas conforme as orientações presentes na tabela 3.

Para fins de facilitação sugere-se que ao utilizar a nova classificação aqui descrita, sejam realizados registros fotográficos e que, à essa imagem registrada, seja aplicada a grade de quadrantes, como o exemplo presente acima na figura 6, para facilitar a correta qualificação e quantificação das aderências, assim como as alterações presentes nos quadrantes.

**Tabela 3** – Graduação de aderências peritoneais proposta para este estudo.

<b>PONTUAÇÃO</b>	<b>TIPO DE ADERÊNCIAS (TA)</b>
<b>0</b>	Sem aderências
<b>2</b>	Aderências entre dois órgãos ou estruturas
<b>3</b>	Aderências entre três órgãos ou estruturas
<b>4</b>	Aderências entre quatro ou mais órgãos ou estruturas

<b>PONTUAÇÃO</b>	<b>INTENSIDADE DE ADERÊNCIAS (IA)</b>
<b>1</b>	Puntiforme
<b>2</b>	Laminar
<b>3</b>	Ampla até metade da superfície do órgão acometido
<b>4</b>	Ampla mais da metade da superfície do órgão acometido
<b>5</b>	Ultrapassa superfície do órgão ou estrutura

<b>PONTUAÇÃO</b>	<b>AGRAVANTES (AG)</b>
<b>+1</b>	Presença de neovascularização
<b>+1</b>	Foco de corpo estranho
<b>+1</b>	Mudança do aspecto do órgão ou estrutura

**Fonte:** Autoria própria.

Para calcular a pontuação, segue-se as orientações acima contidas na tabela 3. Avalia-se cada quadrante individualmente, pontuando o tipo de aderência (TA) que sempre será multiplicado pela pontuação obtida no score de intensidade de aderência (IA). Após resultado soma-se com os agravantes (AG) encontrados. Ressalta-se que os agravantes (AG) são acrescidos tanto na avaliação das aderências quanto na análise estrutural do quadrante (víscera ou parede abdominal). Quando há acometimento da parede abdominal pontua-se em IA do 1 ao 4, não existindo pontuação 5 nesse caso, já que na situação em que ultrapasse o quadrante da parede abdominal, basta somar o acometimento de um novo quadrante pela aderência.

Usa-se a fórmula a seguir:

$((TA \times IA) + AG\text{-encontrados na aderência}) + AG = \text{Pontuação do quadrante}$

Após este resultado soma-se o resultado de todos os quadrantes avaliados e obtém-se o total de pontuação de aderência peritoneal neste animal. É imperativo lembrar que caso haja mais de uma aderência no quadrante, todas elas serão avaliadas de forma qualitativa e quantitativa, sendo atribuída uma pontuação, que serão somadas e somente assim será obtida a pontuação do quadrante, podendo então ser quantificável.

Para fins de simplificação na denominação, o novo método de avaliação macroscópico das aderências peritoneais, proposto nesse projeto, será referenciado nesta dissertação como análise, ou método, quantificável.

### **3.7 Análise estatística**

Visando a validação do novo modelo animal, os resultados foram analisados estatisticamente com o software GraphPadPrism v. 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) e utilizados os testes de Kruskal-Wallis, seguido do Dunn's post hoc.

A fim de comparar as graduações das aderências entre os grupos, foi utilizado o teste U de Mann-Whitney, para grupos não pareados. Sob a hipótese nula, a distribuição de ambos os grupos é a mesma, enquanto que sob a hipótese alternativa essa distribuição é diferente. O nível de significância adotado foi de 5% e o software utilizado foi o R versão 4.2.2.

As análises descritivas foram realizadas por meio de apresentações gráficas e tabelas.

### **3.8 Materiais**

Agulha de Gavagem Rato curva, 54 mm. Bonther®

Bomba quaternária LC-20AT

Celular Samsung S9 Plus, Samsung®

Coluna Shimadzu Shim-Pack CLC-ODS

Controlador CBM-20A

Cromatógrafo líquido de alta eficiência, Shimadzu®

Detector de arranjo de diodos SPD-M 20A

HD Seagate Backup Plus Slim prata 1 TB, Seagate®

Microscópio E 800 Nikon, Nikon®

Notebook Lenovo Yoga 910, Lenovo®

Tablet Surface Go 128 GB, Microsoft®

Scanner de lâminas Leica Aperio CS2, Leica®

Software R®

Software Shimadzu LC versão 1.21 SP1, Shimadzu®

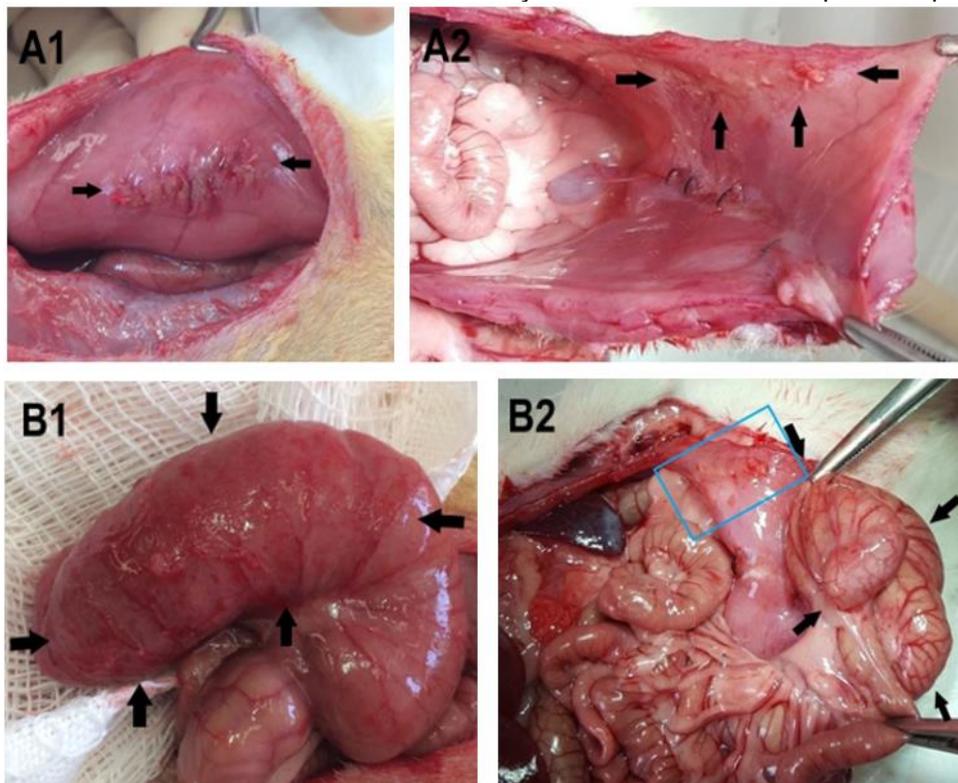
## 4 RESULTADOS

Em nenhum dos 53 animais do estudo, ao ser realizada a primeira laparotomia, foram encontradas aderências peritoneais. No APÊNDICE A encontram-se os registros fotográficos do peritônio de cada animal do experimento, separados em grupos, associado aos cálculos e explicações da quantificação de aderência conforme o método quantificável de avaliação macroscópica das aderências.

### 4.1 Projeto piloto e desenvolvimento do novo Modelo animal de Aderência Peritoneal

Os dois ratos submetidos à abrasão cecal com eletrocauterização do peritônio parietal contralateral, no quadrante inferior esquerdo, seguida de sobressutura da área cauterizada, à necropsia, não apresentavam a formação de aderências peritoneais, embora fosse possível notar alterações decorrentes do procedimento (figura 7).

**Figura 7-** A1: Eletrocauterização do peritônio parietal com sobressutura. A2: Aspecto do peritônio no sétimo dia de pós-operatório. B1: Abrasão cecal. B2: Aspecto do ceco no sétimo dia de pós-operatório. Setas apontam áreas submetidas aos procedimentos cirúrgicos descritos nos modelos animais de aderência peritoneal. Setor em azul marca área de eletrocauterização com sobressutura do peritônio parietal.

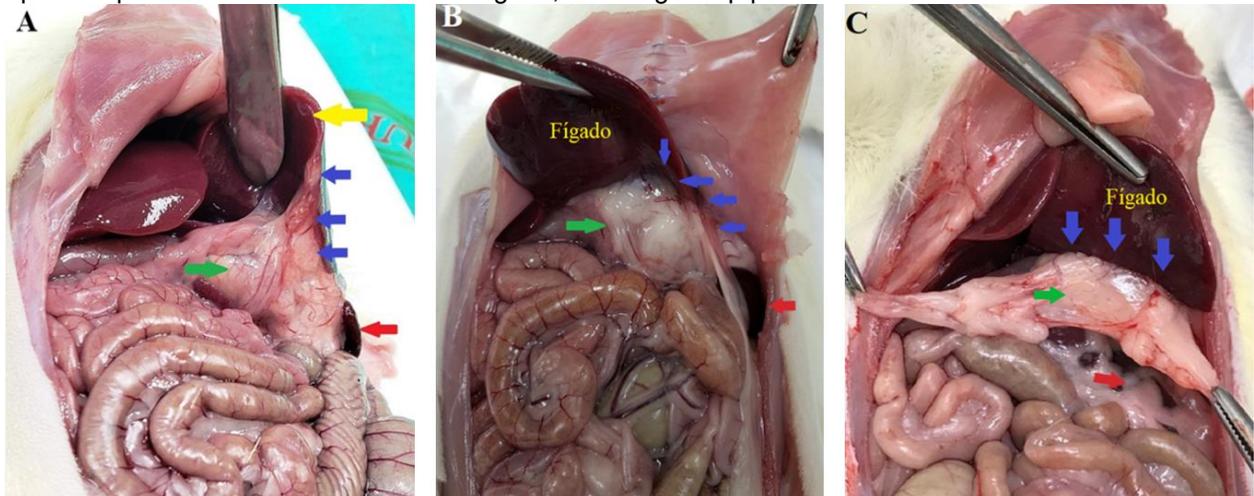


Fonte: Autoria própria.

Como não foi alcançada a formação de aderências peritoneais pós-operatórias, tentou-se a reprodução do modelo de gastroenteroanastomose. O procedimento foi abandonado como modelo experimental pois todos os animais submetidos a este modelo morriam entre o segundo e o quinto dia de pós-operatório.

No desenvolvimento do modelo de gastrotomia seguida de gastrorrafia, os dois primeiros animais foram operados e submetidos à eutanásia no sétimo dia de pós-operatório, sendo notado à necropsia aderências peritoneais em ambos os animais. Os dois animais seguintes (3º e 4º) foram submetidos ao mesmo procedimento, mas em um dos animais teve-se o cuidado de não permitir a exteriorização de segmentos da mucosa gástrica através da sutura e no outro, a sutura foi realizada permitindo a exposição não intencional de partes da mucosa gástrica. No sétimo dia de pós-operatório foi induzida a eutanásia e à necropsia notava-se maior volume de aderências peritoneais no animal em que a exteriorização não intencional de segmentos da mucosa, através da linha de sutura, foi permitida. Os últimos 2 animais (5º e 6º) foram submetidos à incisão e rafia do estômago sem o cuidado de invaginar toda a mucosa gástrica, o que permitiu a exposição não intencional de algumas partes da mucosa através da sutura. No décimo-quarto dia de pós-operatório foram submetidos à eutanásia, sendo notado à necropsia o maior volume de aderências entre todos animais operados no piloto (figuras 8 A, 8 B, 8 C).

**Figura 8** - A, B e C: Imagens representativas de três animais submetidos à gastrotomia seguida de gastrorrafia. Fígado seta amarela, baço seta vermelha, estômago com epíplon seta verde, setas azuis apontam para áreas de aderência entre fígado, estômago e epíplon.



Fonte: Autoria própria.

Visando validar este novo modelo animal, os resultados foram classificados e analisados pelas escalas de Evans<sup>(62)</sup> e Nair<sup>(10)</sup>. A comparação entre o grupo controle e o grupo simulação (sham) não obteve significância estatística, mas ao comparar o grupo controle com o grupo cirurgia, obteve-se significância estatística na escala de Nair<sup>(10)</sup> ( $p < 0,001$ ) e na de Evans<sup>(62)</sup> ( $p < 0,0001$ ). Ao comparar o grupo simulação (sham) com o grupo cirurgia, em ambas as escalas, obteve-se significância estatística com o mesmo p-valor ( $p < 0,05$ ). Com esses graus estatísticos de significância, a hipótese nula foi rejeitada e com isso, as chances deste resultado se repetir com a aplicação do modelo são muito altas, evidenciando sua eficácia na indução de aderências peritoneais pós-operatórias e, portanto, a sua adoção como modelo animal para esta pesquisa.

## **4.2 Grupo Controle**

Os seis animais do grupo controle não manifestaram nenhum sinal de doença e não foram encontradas aderências peritoneais à necropsia. Todos os animais do grupo pontuaram com 0 pontos em todas as 3 escalas de graduação avaliadas (tabelas 1, 2 e 3).

## **4.3 Grupo Simulação (Sham)**

Os seis animais do grupo simulação (sham) evoluíram clinicamente bem até o 14º dia de pós-operatório, quando foi realizada a eutanásia. Durante a necropsia três animais apresentavam aderências peritoneais e três animais apresentavam-se sem aderências.

### **4.3.1 Rato 01**

Ausência de aderências peritoneais, sendo graduado com zero pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 11 pontos, inserido na tabela 8.

### **4.3.2 Rato 02**

Ausência de aderências peritoneais, sendo graduado com zero pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 10 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.3.3 Rato 03

Aderências peritoneais entre o epíplon e a parede abdominal, em cicatriz mediana e entre a gordura epididimal e a parede abdominal em cicatriz mediana, sendo graduado com 02 (dois) pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 19 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.3.4 Rato 04

Aderências peritoneais entre a gordura epididimal e a parede abdominal em cicatriz mediana e do fígado à parede abdominal, através de banda de aderência em formato laminar, sem união direita do órgão à parede, aderindo à cicatriz mediana, sendo graduado com 02 (dois) pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 22 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.3.5 Rato 05

Aderência peritoneal entre a gordura epididimal e a parede abdominal em cicatriz mediana, sendo graduado com 2 (dois) pontos na escala de Evans<sup>(62)</sup> e com 01 (um) ponto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 14 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.3.6 Rato 06

Ausência de aderências peritoneais, sendo graduado com zero pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 8 pontos, inserido na tabela 8.

### 4.4 Grupo Cirurgia

Os seis animais do grupo cirurgia (gastrotomia seguida de gastrorráfia) evoluíram clinicamente bem até o 14º dia de pós-operatório, quando foi realizada a eutanásia. Durante a necropsia todos os animais apresentavam aderências firmes entre o estômago, o fígado e o epíplon.

#### 4.4.1 Rato 01

Aderências firmes entre o estômago, o fígado e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 48 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.4.2 Rato 02

Aderências peritoneais acometendo a parede abdominal em quadrante superior esquerdo, associado as aderências firmes entre o estômago, o fígado e o epíplon, sendo graduado com três pontos na escala de Evans<sup>(62)</sup> e quatro pontos na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 55 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.4.3 Rato 03

Presença de volumosa hérnia incisional totalmente recoberta com aderência de gordura epididimal, que apresentava perda de domicílio localizando-se exclusivamente em região herniária, associado as aderências peritoneais acometendo a parede abdominal em cicatriz mediana e de aderências firmes entre o estômago, o fígado e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 74 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.4.4 Rato 04

Aderências peritoneais acometendo a parede abdominal em quadrante superior esquerdo, associado as aderências firmes entre o estômago, o fígado, o epíplon e a gordura epididimal, sendo graduado com três pontos na escala de Evans<sup>(62)</sup> e quatro pontos na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 67 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.4.5 Rato 05

Aderências peritoneais acometendo a parede abdominal e o epíplon, em cicatriz mediana, associado as aderências firmes entre o estômago, o fígado e o epíplon, sendo

graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 48 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.4.6 Rato 06

Aderências peritoneais acometendo a parede abdominal em quadrante superior esquerdo, associado as aderências firmes entre o estômago, o fígado, o epíplon e a gordura epididimal, sendo graduado com três pontos na escala de Evans<sup>(62)</sup> e quatro pontos na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 62 pontos, inserido na tabela 8.

### 4.5 Grupo Própolis Tópico

Foram utilizados sete animais no total pois o sexto animal operado foi à óbito no pós operatório, sem causa definida, sendo substituído por um novo animal similar aos outros utilizados nesta pesquisa. Os seis animais avaliados no grupo própolis tópico (gastrotomia seguida de gastrorrafia + própolis intraperitoneal em dose única de 300 mg/kg/dia) evoluíram clinicamente bem até o 14º dia de pós-operatório, quando foi realizada a eutanásia. Durante a necropsia todos os animais apresentavam aderências exacerbadas, ultrapassando os limites do fígado, unindo firmemente o estômago, o fígado e o epíplon e, em alguns animais, a aderência acometia também o rim, associado a presença de múltiplos depósitos amarelados em peritônio parietal e visceral tratando-se, provavelmente, de depósitos de própolis.

#### 4.5.1 Rato 01

Intensas aderências peritoneais acometendo a parede abdominal de quadrante superior esquerdo e aglomerado contendo o fígado, o estômago, o epíplon e o baço, associado a outra aderência laminar entre o diafragma e o fígado. Presença ainda de aderências intensas entre o fígado, o estômago, o epíplon e o baço, com focos de substância amarelada em várias áreas do peritônio parietal e visceral, sendo graduado com três pontos na escala de Evans<sup>(62)</sup> e quatro pontos na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 88 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.5.2 Rato 02

Intensas aderências peritoneais acometendo a parede abdominal de quadrante superior esquerdo, no diafragma, e o aglomerado contendo o fígado, o estômago, o epíplon, o baço, uma alça de delgado e o rim. Além destas aderências encontrou-se aderência entre a gordura epididimal e dois pontos da parede abdominal (fora da área da cicatriz mediana). Presença ainda de aderências intensas entre o fígado, o estômago, o epíplon, uma alça de delgado, o rim e o baço, associado a outra aderência entre o delgado, o epíplon e a gordura epididimal, com focos de substância amarelada em várias áreas do peritônio parietal e visceral, sendo graduado com três pontos na escala de Evans<sup>(62)</sup> e quatro pontos na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 104 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.5.3 Rato 03

Presença de aglomerado contendo o fígado, o estômago, o epíplon, o baço e o rim. Além destas aderências encontrou-se aderência entre o duodeno e o fígado e entre uma alça de delgado e o fígado. Focos de substância amarelada em várias áreas do peritônio parietal e visceral, sendo graduado com três pontos na escala tanto de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 84 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.5.4 Rato 04

Presença de aglomerado contendo o fígado, o estômago, o epíplon, o baço e a fáscia de Gerota. Além destas aderências encontrou-se aderência entre as gorduras epididimais. Focos de substância amarelada em várias áreas do peritônio parietal e visceral, sendo graduado com três pontos na escala tanto de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 79 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.5.5 Rato 05

Notava-se dois focos de aderência acometendo a parede abdominal, o primeiro ligava, no quadrante 11', o apêndice xifóide e o diafragma ao fígado e o epíplon, o

segundo foco acometendo a parede e o diafragma em quadrante superior esquerdo em aglomerado contendo o fígado, o estômago, o epíplon, o baço e a fáscia de Gerota à esquerda. Foram encontrados também focos de substância amarelada em várias áreas do peritônio parietal e visceral, sendo graduado com três pontos na escala de Evans<sup>(62)</sup> e quatro pontos na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 139 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.5.6 Rato 06

Aderência acometendo o fígado, o estômago e o epíplon. Focos de substância amarelada em várias áreas do peritônio parietal e visceral, sendo graduado com três pontos na escala tanto de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 48 pontos, inserido na tabela 8.

### 4.6 Grupo Própolis 100 mg/kg/dia

Os seis animais do grupo própolis 100 mg/kg/dia (gastrotomia seguida de gastrorrafia + dose diária de própolis 100 mg/kg) evoluíram clinicamente bem até o 14º dia de pós-operatório, quando foi realizada a eutanásia. A quantidade e extensão das aderências foram variadas e pormenorizadas a seguir.

#### 4.6.1 Rato 01

Mínimas aderências peritoneais entre o fígado e o estômago, de aspecto laminar, sendo graduado com dois pontos na escala de Evans<sup>(62)</sup> e um ponto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 23 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.6.2 Rato 02

Aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 31 pontos, explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8.

#### 4.6.3 Rato 03

Aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 31 pontos, inserido na tabela 8:

#### 4.6.4 Rato 04

Aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, este animal pontuava com 29 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.6.5 Rato 05

Aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, associado as aderência laminar entre o diafragma esquerdo e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, esse animal pontuava com 33 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.6.6 Rato 06

Aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, esse animal pontuava com 33 pontos, inserido na tabela 8.

### **4.7 Grupo Própolis 300 mg/kg/dia**

Foram utilizados oito animais no total, já que o primeiro e o quinto animais foram excluídos e substituídos por dois novos animais, similares a todos os outros utilizados nesta pesquisa. O primeiro animal operado apresentou parada cardiorrespiratória no oitavo dia de pós operatório, provavelmente por broncoaspiração, durante a administração da solução de própolis por gavagem. Foram realizadas manobras de ressuscitação, com compressão externa da caixa torácica e o animal foi mantido vivo sendo realizada a eutanásia no 14º dia de pós-operatório, sem nova administração de própolis. À eutanásia, notava-se a presença de moderadas aderências entre o fígado, o estômago e o epíplon. O quinto animal foi encontrado morto no sexto dia de pós-

operatório, à necropsia apresentava aderência leve entre o fígado e o estômago somente em área da sutura gástrica. A *causa mortis* não foi definida.

Os seis animais analisados no grupo própolis 300 mg/kg/dia (gastrotomia seguida de gastrorrafia + dose diária de própolis 300 mg/kg) evoluíram clinicamente bem até o 14º dia de pós-operatório, quando foi realizada a eutanásia. A quantidade e extensão das aderências foram variadas e pormenorizadas a seguir.

#### 4.7.1 Rato 01

Aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, associado as três focos de aderência à parede abdominal, a saber: gordura epididimal à cicatriz mediana, fígado ao diafragma e o aglomerado contendo o fígado, o estômago, o epíplon e o baço, aderindo ao diafragma e à parede abdominal de hipocôndrio esquerdo, sendo graduado com três pontos na escala de Evans<sup>(62)</sup> e quatro pontos na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, esse animal pontuava com 78 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.7.2 Rato 02

Aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, esse animal pontuava com 34 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.7.3 Rato 03

Ausência de aderências, sendo graduado com zero pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, esse animal pontuava com 12 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.7.4 Rato 04

Aderência entre o fígado, o estômago e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, esse animal pontuava com 33 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.7.5 Rato 05

Aderência entre o fígado, o estômago e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, esse animal pontuava com 30 pontos, inserido na tabela 8.

#### 4.7.6 Rato 06

Ausência de aderências peritoneais, sendo graduado com zero pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6). Pela tabela quantificável, esse animal pontuava com 13 pontos, inserido na tabela 8.

### 4.8 Análises estatísticas

#### 4.8.1 Análises estatísticas dos resultados obtidos segundo a graduação descrita por Evans<sup>(62)</sup>

Ao avaliar os ratos do grupo controle, nenhum dos animais possuía aderência peritoneal, por isso todos foram graduados com 0 pontos. Entre os ratos do grupo simulação (sham), três ratos possuíam aderências que eram passíveis de ruptura por tração, sendo, portanto, graduados com 2 pontos e três ratos não possuíam aderências peritoneais, sendo graduados com zero pontos. Todos os ratos, tanto do grupo cirurgia quanto do grupo própolis tópico apresentavam aderências peritoneais que necessitariam de instrumentos cortantes para separá-las. Nos ratos do grupo própolis 100 mg/kg/dia, 5 ratos possuíam aderências peritoneais que necessitariam de instrumentos cortantes para separá-las e um animal possuía aderências peritoneais em que bastaria tração para separação das estruturas aderidas. Nos ratos do grupo própolis 300 mg/kg/dia, 4 ratos possuíam aderências peritoneais que necessitariam de instrumentos cortantes para separá-las e dois ratos não possuíam aderências peritoneais. Essas informações podem ser melhor avaliadas na tabela 4, onde os dados estão sintetizados.

**Tabela 4** – Resultados segundo graduação de aderências peritoneais proposta por Evans<sup>(62)</sup>

Rato	Controle	Simulação (Sham)	Cirurgia	Própolis Tópico	Própolis 100mg/kg/dia	Própolis 300mg/kg/dia
1	0	0	3	3	2	3
2	0	0	3	3	3	3
3	0	2	3	3	3	0
4	0	2	3	3	3	3
5	0	2	3	3	3	3
6	0	0	3	3	3	0

Fonte: Autoria própria.

Ao analisar os dados da tabela 4, foram observadas apenas graduações de aderências iguais a zero no grupo controle, e iguais a 3, nos grupos Cirurgia e Própolis Tópico. Assim, o teste estatístico para a comparação desses grupos não se aplica, uma vez que não foi observada variabilidade nestas amostras, sendo realizada somente a análise descritiva, por meio de tabelas.

Entre os grupos que poderiam ser analisados, apresentaram diferença estatisticamente significantes quando comparados o grupo Simulação (Sham) com os grupos Cirurgia ( $p$ -valor = 0,0022), Própolis Tópico ( $p$ -valor = 0,0022) e Própolis 100mg/kg/dia ( $p$ -valor = 0,0087). Não foram observadas diferenças significativas quando comparados o grupo cirurgia com os grupos própolis por gavagem ou quando comparados os grupos de Própolis 100mg/kg/dia e o Própolis 300mg/kg/dia ( $p$ -valor = 0,4545). (Tabela 5)

**Tabela 5** – Resultados do teste U de Mann-Whitney para a graduação das aderências segundo a escala de Evans<sup>(62)</sup>

Comparação entre os Grupos		p-valor	
<b>Simulação (Sham)</b>	<b>X</b>	<b>Cirurgia</b>	0,0022
		<b>Própolis Tópico</b>	0,0022
		<b>Própolis 100mg/kg/dia</b>	0,0087
		<b>Própolis 300mg/kg/dia</b>	0,1991
<b>Cirurgia</b>	<b>X</b>	<b>Própolis 100mg/kg/dia</b>	1,0000
		<b>Própolis 300mg/kg/dia</b>	0,4545
<b>Própolis 100mg/kg/dia</b>	<b>X</b>	<b>Própolis 300mg/kg/dia</b>	0,4545

Fonte: Autoria própria.

#### 4.8.2 Análises estatísticas dos resultados obtidos segundo a graduação descrita por Nair<sup>(10)</sup>

Ao avaliar os ratos do grupo controle, nenhum dos animais possuía aderência peritoneal, por isso todos foram graduados com 0 pontos. Entre os ratos do grupo simulação (sham), três ratos não possuíam aderências peritoneais, sendo graduados com zero pontos, dois ratos possuíam duas bandas de aderência, sendo, portanto, graduados com 2 pontos e um rato possuía banda de aderência única, sendo graduado com 1 ponto. Tanto no grupo cirurgia quanto do grupo própolis tópico haviam três ratos com aglomerado de alças sendo graduados com 3 pontos e três ratos com aderência do aglomerado de alças ligando direto à parede abdominal, sendo graduado com 4 pontos. Nos ratos do grupo própolis 100 mg/kg/dia, 5 ratos possuíam aderências peritoneais com aglomerado de alças sendo graduados com 3 pontos e um rato possuía aderência peritoneal em banda única de aderência, sendo graduado com 1 ponto. Nos ratos do grupo própolis 300 mg/kg/dia, um rato apresentava-se com um aglomerado de alças que se ligavam diretamente à parede abdominal, sendo graduado com 4 pontos, 3 ratos possuíam aderências peritoneais em aglomerado de alças sendo graduados com 3 pontos e dois ratos não apresentavam aderências peritoneais, sendo graduados com

zero pontos. Essas informações podem ser melhor avaliadas na tabela 6, onde os dados estão sintetizados.

Ao analisar os dados da tabela 6, foram observadas amostras idênticas para os grupos Cirurgia e Própolis Tópico, sendo a metade dos ratos ( $n = 3$ ) classificados como 3 e a outra metade como 4, além de resultados idênticos em todos os animais do grupo controle. Assim, o teste estatístico para a comparação desses grupos não se aplica, uma vez que não foi observada variabilidade nestas amostras, sendo realizada a análise descritiva, por meio de tabelas.

**Tabela 6** – Resultados segundo graduação de aderências peritoneais proposta por Nair<sup>(10)</sup>.

Rato	Controle	Simulação (Sham)	Cirurgia	Própolis Tópico	Própolis 100mg/kg/dia	Própolis 300mg/kg/dia
1	0	0	3	4	1	4
2	0	0	4	4	3	3
3	0	2	3	3	3	0
4	0	2	4	3	3	3
5	0	1	3	4	3	3
6	0	0	4	3	3	0

**Fonte:** Autoria própria.

Ao analisar os resultados obtidos com a escala de graduação proposta por Nair<sup>(10)</sup>, foram observadas diferenças significativas entre o grupo Simulação (Sham) e os grupos Cirurgia ( $p$ -valor = 0,0022), Própolis Tópico ( $p$ -valor = 0,0022) e Própolis 100mg/kg/dia ( $p$ -valor = 0,0087). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de Própolis oral ( $p$ -valor = 0,7576). (Tabela 7)

**Tabela 7** – Resultados do teste U de Mann-Whitney para a graduação das aderências segundo a escala de Nair<sup>(10)</sup>.

<b>Comparação entre os Grupos</b>		<b>p-valor</b>	
<b>Simulação (Sham)</b>	<b>X</b>	<b>Cirurgia</b>	0,0022
		<b>Própolis Tópico</b>	0,0022
		<b>Própolis 100mg/kg/dia</b>	0,0087
		<b>Própolis 300mg/kg/dia</b>	0,1775
<b>Cirurgia</b>	<b>X</b>	<b>Própolis Tópico</b>	1,0000
		<b>Própolis 100mg/kg/dia</b>	0,1212
		<b>Própolis 300mg/kg/dia</b>	0,2316
<b>Própolis 100mg/kg/dia</b>	<b>X</b>	<b>Própolis 300mg/kg/dia</b>	0,7576

**Fonte:** Autoria própria.

#### 4.8.3 Análises estatísticas dos resultados obtidos segundo o método quantificável de graduação macroscópica das aderências.

Com esse novo método de avaliação macroscópica das aderências, a única possibilidade de se obter zero pontos é em um animal que não possui qualquer alteração intraperitoneal, ou seja, somente aos animais do grupo controle poderiam ser atribuídos zero pontos, isso se não apresentassem alterações, como a presença de aderências primárias. Qualquer alteração encontrada, que não seja o que é anatomicamente esperado, receberia algum grau de pontuação. Entre os outros grupos, os animais foram pontuados de 8 a 139 pontos, sendo observada maior variabilidade entre as graduações, com o grupo Própolis Tópico apresentando os maiores valores e a maior amplitude. Esses dados podem ser melhor avaliados na tabela 8 com os resultados compilados.

**Tabela 8** – Resultados segundo graduação do método quantificável de graduação macroscópica das aderências.

Rato	Controle	Simulação (Sham)	Cirurgia	Própolis Tópico	Própolis 100mg/kg/dia	Própolis 300mg/kg/dia
1	0	11	48	88	23	78
2	0	10	55	104	31	34
3	0	19	74	84	31	12
4	0	22	67	79	29	33
5	0	14	48	139	33	30
6	0	8	62	48	33	13

Fonte: Autoria própria.

As medianas dos grupos em que foi administrado o própolis por gavagem foram próximas, porém, no grupo 300mg/kg/dia houve maior variação, com a ocorrência de um ponto fora da curva (*outlier*). Na comparação entre os grupos, não foi observada a interseção entre os intervalos de resultados obtidos com os grupos controle, simulação (sham), cirurgia e própolis 100mg/kg/dia. (Figura 9)

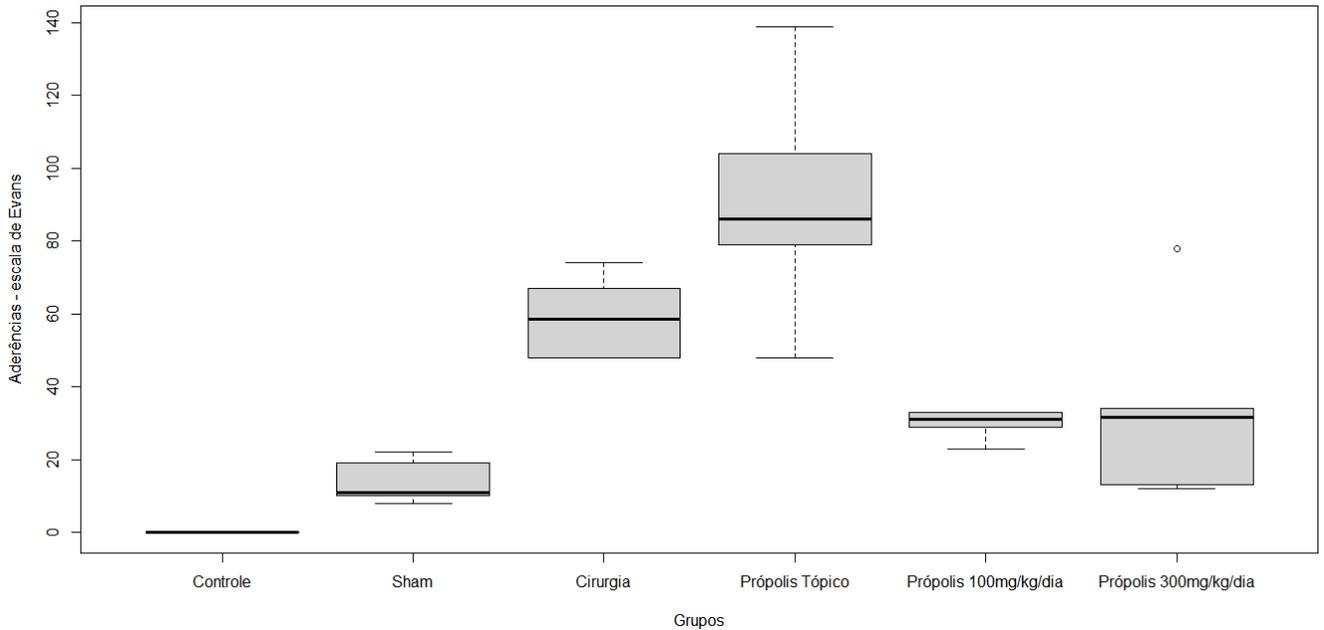
Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos controle e simulação (sham), e todos os outros grupos, ou seja, os grupos cirurgia, própolis tópico, própolis 100mg/kg/dia e própolis 300mg/kg/dia apresentavam, sob análise estatística, mais aderências que esses dois grupos. Quando se comparou o grupo cirurgia com o grupo própolis tópico, houve diferença estatisticamente significativa (p-valor 0,0411), evidenciando aumento da formação de aderências peritoneais pós-cirúrgicas com a aplicação de própolis por via intraperitoneal. Ao se comparar o grupo cirurgia com o grupo própolis 100mg/kg/dia, nota-se diferença estatisticamente significativa (p-valor 0,0022), com redução da formação das aderências peritoneais pós-cirúrgicas após a utilização do própolis enteral nesta dosagem. A comparação entre o grupo cirurgia e o grupo própolis 300mg/kg/dia não obteve significância estatística, porém com um p-valor limítrofe e a ocorrência de um ponto fora da curva (sem menor formação de aderências com o tratamento). Esses dados podem ser avaliados na tabela 9.

**Tabela 9** – Resultados do teste U de Mann-Whitney para a graduação das aderências segundo o método quantificável de graduação macroscópica das aderências.

Comparação entre os Grupos		p-valor	
<b>Simulação (Sham)</b>	<b>X</b>	<b>Cirurgia</b>	0,0022
		<b>Própolis Tópico</b>	0,0022
		<b>Própolis 100mg/kg/dia</b>	0,0022
		<b>Própolis 300mg/kg/dia</b>	0,0238
<b>Cirurgia</b>	<b>X</b>	<b>Própolis Tópico</b>	0,0411
		<b>Própolis 100mg/kg/dia</b>	0,0022
		<b>Própolis 300mg/kg/dia</b>	0,0563
<b>Própolis 100mg/kg/dia</b>	<b>X</b>	<b>Própolis 300mg/kg/dia</b>	0,9091

Fonte: Autoria própria.

**Figura 9** - Diagrama de caixa para a graduação de aderências peritoneais entre os grupos segundo o método quantificável de graduação macroscópica das aderências.



Fonte: Autoria própria.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.2 Modelos animais de indução de aderência peritoneal.

Existem inúmeros modelos animais de indução de aderências peritoneais<sup>(1, 4, 6-8, 10-14, 17-19, 21, 22, 61, 62, 64, 66-69)</sup>, não havendo necessidade de citar individualmente cada modelo já descrito na história da cirurgia experimental, porém cabe ressaltar que a maioria desses modelos vão contra as orientações de minimização de danos que iniciou-se com os princípios de Halsted e vem sendo frequentemente atualizado com a introdução de novas orientações para minimizar o dano peritoneal.

Não há na literatura pesquisada um modelo animal considerado padrão ouro, ou que induza a formação de aderências peritoneais em todos os animais que foram submetidos ao modelo proposto. Para o estudo de aderências peritoneais em cirurgia experimental é imprescindível a utilização de um modelo que induza a formação aderências peritoneais pós-operatórias em todos os animais operados. Caso fosse proposta uma pesquisa para a prevenção da formação das aderências, em associação a um modelo animal que não induz aderências em todos os animais operados, não seria possível garantir que a redução da intensidade ou até mesmo a ausência das aderências tenha ocorrido pelo tratamento proposto ou pela ineficácia do modelo animal adotado em induzir aderências peritoneais de forma constante e estável. Portanto o uso de um modelo animal que possa falhar em causar aderências não deveria ser aproveitado em qualquer tipo de pesquisa com aderências.

Foram testados três modelos de indução de aderência peritoneal em ratos, antes do início do projeto, para avaliar se algum modelo animal se enquadraria nas necessidades acima expostas, para que então fosse adotado como padrão para a pesquisa. Nenhum dos três modelos obteve sucesso na indução de aderências peritoneais ou por não ter induzido a formação de aderências (abrasão cecal associado a cauterização com sutura do peritônio parietal contralateral) ou por ter levado ao óbito todos os animais operados (gastroenteroanastomose).

Este fato despertou a necessidade de desenvolver um modelo animal capaz de induzir a formação de aderências peritoneais em todos os animais ao qual foi submetido,

de fácil reprodução e seguro para os animais, ou seja com baixa incidência de complicações.

Para o desenvolvimento desse modelo, estudou-se algum dos modelos disponíveis na literatura<sup>(1, 4, 6-8, 10-14, 17-19, 21, 22, 61, 62, 64, 66-69)</sup>, porém causa estranheza que os modelos adotados utilizem manobras que ou não são adotadas ou são proscritas na prática médico-cirúrgica, como o uso de álcool em alças intestinais, ressecção ou escarificação do peritônio (parietal e/ou visceral), ou o trauma deliberado ao órgão sem intenção terapêutica, além do uso de substâncias que causem reação tipo corpo estranho. Portanto, grande parte dos modelos animais para indução de aderências peritoneais utiliza técnicas que, se utilizadas em humanos, seriam consideradas má prática médica, somando-se ao fato de que caso existam aderências em humanos formados por processos similares, devem ser um parcela inexpressiva dos casos.

O novo modelo, além de precisar ser eficaz na formação de aderências peritoneais, deveria simular situações similares a um procedimento cirúrgico como os realizados na clínica cirúrgica humana e que obedecesse aos preceitos da boa técnica operatória.

O novo modelo animal de aderência peritoneal desenvolvido para este estudo mostrou ser capaz de preencher todos os pré-requisitos citados anteriormente, ao ser capaz de induzir a formação de aderências sempre que aplicado e, além dessa qualidade sem similar na literatura, as aderências formadas apresentam sempre o mesmo padrão, com pouca variabilidade na extensão da aderência, o que permite um grau de presunção de resultados facilitando a comparação entre os animais desta pesquisa e possibilitando esta análise comparativa ao ser utilizado em pesquisas futuras. Outro ponto importante deste modelo é que preconiza-se a utilização da técnica asséptica, o manuseio delicado e a dissecação minimamente necessária para a realização de um procedimento gástrico que apresenta similaridade com os realizados em humanos. Esta operação nunca seria utilizada em humanos com a intenção de induzir a formação de aderências peritoneais, mas é um procedimento que pode ser realizado no intuito de retirar um corpo estranho da cavidade gástrica ou na ressecção de tumores da parede do estomago como os tumores estromais gastrointestinais (GIST). O resultado final de ressecção de um GIST

seria como uma gastrotomia seguida de gastrorrafia. Por último, foi um modelo animal que causou pouca morbidade e sem mortalidade, visto que todos os animais operados segundo este modelo evoluíram bem no pós-operatório, sem manifestar sinais de dor, doença ou estresse.

### **5.3 Métodos de avaliação macroscópica das aderências.**

Quanto aos métodos de avaliação macroscópica, vários sistemas foram descritos na literatura<sup>(1, 4, 6-14, 17, 20, 62, 64, 67)</sup>, sendo que todos poderiam ser considerados semiquantitativos, já que não consideram o volume total de aderências encontrados na cavidade peritoneal, mas somente o “pioor tipo” de aderência encontrada.

Tomemos como exemplo a escala usada por Evans<sup>(62)</sup> que, ou foi replicada por outros autores<sup>(64)</sup>, ou utilizaram classificações muito similares<sup>(4, 11, 21)</sup>, nestes métodos de avaliação macroscópica, avalia-se somente o grau de dificuldade em causar a ruptura da aderência, quanto mais aderido e de difícil ruptura, maior a pontuação, não importando se acometia toda a cavidade peritoneal ou somente uma área ínfima da cavidade peritoneal. Outros métodos optaram por avaliar o aspecto e o número das aderências, como a escala de Nair<sup>(10)</sup>, que é replicada em outras publicações<sup>(1, 6, 8)</sup> ou outros que avaliam a aderência sem buscar ruptura<sup>(9, 12-14, 67)</sup>, havendo inclusive métodos que mesclam diversos parâmetros<sup>(7, 17, 20)</sup> combinando análises macroscópicas com microscópicas e etc., provavelmente, tentando ser o mais fiel possível ao que se encontra na cavidade abdominal.

Porém todos esses modelos caem no mesmo viés, independentemente da quantidade de superfície peritoneal acometida pelo processo adesivo, o que será avaliado e graduado é somente o “mais intenso” encontrado na cavidade peritoneal e esta será a pontuação atribuída ao animal. Portanto nenhuma das escalas encontradas na literatura podem ser consideradas quantificáveis, todos esses meios de quantificação macroscópica são semiquantitativos. Na tentativa de corrigir este problema, Coccolini<sup>(9)</sup> publicou um novo modelo de quantificação das aderências peritoneais, utilizando a ideia do Índice de Carcinomatose Peritoneal (PCI, sigla em inglês), associada a graduação da escala de Evans<sup>(62)</sup> aos quadrantes no abdome. Porém, apesar de parecer uma análise quantificável, são na verdade dez análises semiquantitativas da cavidade peritoneal, pois

caso haja mais de uma aderência no mesmo quadrante, somente a mais intensa será graduada, além de não avaliar a extensão real do acometimento do órgão pela aderência.

Outro ponto importante a ser avaliado é que a adoção de métodos que necessitem gerar ruptura, no intuito de avaliar as aderências, impediria qualquer outra análise da aderência que não a análise macroscópica impedindo, por exemplo, a avaliação microscópica.

Por esse motivo foi desenvolvido um novo método de avaliação macroscópica das aderências peritoneais, quantitativo e qualitativo, para ser utilizado nessa pesquisa. Como toda a cavidade peritoneal é avaliada quanto a extensão, a severidade e o número de aderências, onde em um mesmo quadrante vários focos de aderência podem ser avaliados, classificados e somados, sem um valor máximo atribuível à pontuação, esse método pode ser considerado quantificável.

Um exemplo da necessidade de um novo modelo de avaliação macroscópica das aderências se dá ao avaliar as aderências encontradas no Rato 5 do grupo 100 mg/kg/dia. A aderência entre o fígado/epíplon e a cúpula diafragmática não é tão exuberante quanto as similares, encontradas no grupo cirurgia, apresentando aspecto laminar, o que gera a dúvida se deveria ser graduado com o grau 2 ou o grau 3, segundo o método de Evans<sup>(62)</sup> e se deveria ser graduado com o grau 3 ou o grau 4, segundo o método de Nair<sup>(10)</sup>. Falta na literatura, até o presente momento, um método definitivo e completo de avaliação macroscópica das aderências peritoneais.

Após os dados expostos acima, consonante com a afirmação de Wei<sup>(4)</sup> que refere faltarem métodos acurados de avaliação da severidade das aderências peritoneais e com o relatado por Harris<sup>(19)</sup> que expõe problemas relacionados ao estudo das aderências peritoneais, aos quais atribui à diversidade de modelos animais adotados em pesquisa animal, associado à falta de um sistema objetivo de graduação das aderências peritoneais, como os possíveis motivos responsáveis pela falta de sucesso em descobrir como prevenir a formação de aderências peritoneais.

Este estudo avaliou os resultados obtidos de três formas, utilizando diferentes modelos macroscópicos de classificação das aderências. Foram avaliados conforme os

métodos, já consagrados em literatura específica, publicados por Nair<sup>(10)</sup> e Evans<sup>(62)</sup>, que possuem um limite máximo para a graduação das aderências encontradas e possuem pequena variabilidade nos resultados, podendo ser, respectivamente, graduados de 0 a 4 pontos e de 0 a 3 pontos. Essas limitações foram suficientes para impedir a correta representação estatística dos resultados encontrados, evitando que fosse atribuída significância estatística ao que era notável na avaliação macroscópica. O terceiro método para avaliação utilizado foi o método quantificável de graduação macroscópica das aderências.

O método quantificável de avaliação macroscópica das aderências, desenvolvido para esta pesquisa permitiu um tipo de graduação macroscópica que até o presente momento não possui paralelos. A ausência de limite na pontuação permite expressar em números todas as alterações que podem ser observadas pelo avaliador. Não somente as aderências poderiam ser graduadas como outras alterações diversas em relação a anatomia normal. A importância desta amplitude de graduação está no fato de que mesmo que não tenha ocorrido a formação da aderência, pois os processos homeostáticos levaram a uma cicatrização fisiológica, existe um dano que poderia tê-la causado e por isso, devendo portanto ser quantificado e pontuado como agravante.

Por ser ilimitado, este novo modelo de graduação possibilita uma grande variabilidade nos resultados, permitindo a correta comparação estatística e a atribuição de resultados com significância estatística, consonante com os achados.

#### **5.4 Resultados obtidos com o uso do própolis.**

A administração do própolis neste estudo, visava estudar seu efeito de duas formas distintas. A primeira, de forma enteral, e a segunda, de forma tópica, traçando-se um paralelo com o uso do mel de forma intraperitoneal em modelos de aderências, que apresentou bons resultados na redução da formação de aderências peritoneais pós-cirúrgicas<sup>(12, 15, 64)</sup>.

##### **5.4.1 O própolis tópico.**

O único estudo encontrado com proposta similar, de administração intraperitoneal de própolis, foi um estudo polonês de 1984<sup>(69)</sup>, em que foi administrado extrato alcoólico

de própolis no peritônio. Este estudo além de considerar a aplicação intraperitoneal de própolis um tratamento duvidoso, refere que foram encontrados depósitos de substância negra no peritônio, provavelmente depósitos de própolis. Corroborando o achado deste estudo, foram encontrados focos de pigmento amarelado disseminados nas cavidades peritoneais de todos os animais do grupo própolis tópico, provavelmente, focos de própolis verde depositado. A diferença na coloração deve ter ocorrido por ser um tipo diferente de própolis. Enquanto o própolis utilizado no nosso estudo é uma amostra de própolis verde, com a origem específica em uma espécie única da flora, a *Baccharis dracunculifolia*, o própolis utilizado por Pardela<sup>(69)</sup> se tratava provavelmente do própolis marrom, que é obtido ao utilizar os extratos de uma flora diversificada, explicando a diferença na coloração.

Apesar do resultado não ter sido satisfatório no estudo conduzido por Pardela<sup>(69)</sup>, foi optado por pesquisar o uso intraperitoneal do extrato aquoso de própolis verde. A razão desta escolha foi por supor que havia algum grau de dano ao peritônio causado pelo álcool do extrato alcóolico de própolis, que poderia aumentar o estímulo adesiogênico, antagonizando o efeito benéfico que o própolis poderia, hipoteticamente, possuir na prevenção da formação das aderências peritoneais.

Ao avaliar os resultados encontrados à necropsia dos animais do grupo própolis tópico, encontrou-se, além dos focos de própolis já citados, grande aumento da quantidade e da intensidade das aderências peritoneais. Isto deve ter sido causado pela presença da parte resinosa do própolis, que não seria absorvida, gerando reação inflamatória tipo corpo estranho similar ao que acontece com o talco, aumentando o estímulo à formação de aderências. Em comparação com o grupo cirurgia, que foi o modelo adotado para a indução de aderências peritoneais no projeto, havia grande aumento das aderências pós-operatórias encontradas, com diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,0411$ ), o que confirma a hipótese de que a aplicação de própolis intraperitoneal causa piora do processo cicatricial no peritônio exacerbando a formação de aderências.

Outro achado marcante é o de que todos os ratos do grupo própolis tópico apresentavam edema e escurecimento do fígado, sugerindo algum tipo de toxicidade

hepática induzida pelo própolis administrado de forma intraperitoneal. Este achado é algo novo na literatura já que não há relatos de toxicidade do própolis e principalmente por ter apresentado efeito hepatoprotetor<sup>(23)</sup>. A aplicação do própolis de forma tópica, no peritônio, pode ter apresentado algum efeito deletério pela resina ou por outro componente, ou ter sido atingida uma dosagem tóxica do própolis nessa dose de 300mg/kg. Outro dado que corrobora algum grau de toxicidade sofrido pelos animais deste grupo é a ocorrência de um óbito sem causa aparente, apesar de os outros animais do mesmo grupo terem apresentado bom ganho de peso. O motivo dessas alterações não foi esclarecido em nosso estudo e pode ser foco de pesquisas no futuro.

Independentemente de o própolis induzir ou não algum grau de toxicidade quando administrado de forma tópica no peritônio, percebeu-se um grande aumento do volume e da extensão das aderências peritoneais, induzindo um aumento perceptível macroscopicamente do número de vasos neoformados. Portanto concluiu-se que, ao contrário do uso tópico em feridas cutâneas, o própolis tópico intraperitoneal é deletério para o processo de cicatrização, induzindo reação cicatricial exacerbada e, conseqüentemente, desfavorável. Esta ação do própolis de deu, provavelmente, pela reação tipo corpo estranho visto que tanto neste estudo como no estudo conduzido por Pardela<sup>(69)</sup>, foram encontrados depósitos de substância desconhecida no peritônio, gerando um resultado diferente do que foi encontrado ao administrar mel de forma intraperitoneal. O mel, além de ser totalmente absorvido, foi capaz de reduzir a formação de aderências peritoneais<sup>(12, 64)</sup>.

#### 5.4.2 O própolis enteral.

Quando avaliado o uso enteral do própolis, administrado por gavagem, percebemos um efeito diferente do encontrado com o uso tópico do própolis, sendo notada a redução na intensidade das aderências peritoneais, apresentando resultados similares aos obtidos com a administração de mel e pólen por via oral<sup>(15)</sup>.

Quando comparados os grupos em que foram administradas dosagens diferentes de própolis por gavagem, o grupo 100 mg/kg/dia apresentava menor variabilidade. No 300 mg/kg/dia, alguns animais apresentavam mais aderências que no grupo que recebeu

o própolis na dosagem de 100 mg/kg/dia e outros animais apresentavam-se sem nenhuma aderência pós-operatória.

Todos os ratos do grupo 100 mg/kg/dia possuíam, na área de aderência entre o fígado e o estômago, um padrão de aderência focalizada ligando a face posterior do fígado à face anterior do estômago, somente próximo à área de sutura, sem a aderência de toda a parede gástrica anterior, sem ultrapassar a borda hepática e frequentemente sendo visível a linha de sutura da gastrorrafia, o que evidenciava pouquíssima reação cicatricial do tipo formação de aderência.

Como já relatado previamente, os ratos do grupo 300 mg/kg/dia possuíam uma maior variabilidade de resultados. Em um dos animais o padrão das aderências peritoneais era similar ao grupo cirurgia, com aderências extensas. Em três animais havia um padrão de aderências similar ao encontrado nos animais do grupo 100 mg/kg/dia e em dois animais havia a ausência de aderências entre o estômago e o fígado, evidenciando um efeito antiadesiogênico excepcional, nesses dois ratos, com uma dosagem maior de própolis enteral. Como citado no item 4.7, o modelo animal empregado neste experimento era capaz de induzir, sempre que aplicado, aderências intensas e volumosas o que pode ser evidenciado ao avaliar os resultados obtidos com o grupo cirurgia.

Ao analisar estatisticamente os resultados obtidos em cada um dos grupos e avaliando conforme o método quantificável de graduação macroscópica das aderências, obteve-se significância estatística ao comparar o grupo 100 mg/kg/dia com o grupo cirurgia ( $p$  0,0022), o que comprova que o uso de própolis enteral nesta dosagem possui efeito protetor contra a formação de aderências peritoneais. Ao se comparar o grupo 300 mg/kg/dia com o grupo cirurgia não se obteve significância estatística, porém, como o  $p$ -valor era limítrofe ( $p$  0,0563), indica que a diferença não foi evidenciada, provavelmente, pela existência do ponto fora da curva. Neste caso, o aumento do tamanho amostral poderia trazer maior clareza para a existência ou não de diferença significativa entre os grupos.

Assim como no uso do própolis tópico, pode ter havido algum grau de toxicidade induzida pelo própolis na dosagem de 300 mg/kg/dia, primeiramente pela ocorrência de

um óbito sem causa aparente e também pela grande variabilidade dos achados intraperitoneais relacionados às aderências, inclusive com a ocorrência de um ponto fora da curva. A presença de animais com maior capacidade de utilização/metabolização do própolis poderia justificar como alguns obtiveram um efeito mais expressivo, com intensa redução na formação de aderências e como outros apresentaram menor efeito na redução das aderências peritoneais, podendo até mesmo ter ocorrido toxicidade. Estudos futuros podem ser realizados para avaliar se foi atingida uma dosagem tóxica do própolis.

O único estudo encontrado em literatura que pesquisa os efeitos do própolis enteral em modelos de aderência foi o publicado em 2018 por Askari et al<sup>(1)</sup>. Neste estudo foi administrada diariamente as dosagens de 50, 100 e 200 mg/kg/dia e avaliados macroscopicamente pelo método publicado por Nair<sup>(10)</sup>, que também foi utilizado em nosso estudo. Os resultados obtidos por Askari<sup>(1)</sup> foram similares aos obtidos em nossa pesquisa, onde havia efeito protetor na prevenção das aderências peritoneais pós-cirúrgicas, porém com efeito dose-dependente, com maior efeito quanto maior a dose. Os grupos que utilizaram o própolis nas dosagens de 100 e 200 mg/kg/dia apresentaram diminuição estatisticamente significativa das aderências quando comparados com o grupo cirurgia e o grupo 50 mg/kg/dia. Porém este autor<sup>(1)</sup> utilizou como modelo animal a abrasão cecal, que possui o risco de não induzir a formação de aderências peritoneais em todos os casos, ou poderia induzir a formação de aderências pouco expressivas. Além disso, foi utilizado para a análise macroscópica, o método descrito por Nair<sup>(10)</sup>, que possui variabilidade pequena entre as graduações máximas e mínimas e pode não ser capaz de expressar em graduação toda a gama de resultados macroscópicos encontrados.

Como não há outros estudos para comparação, foi comparado o resultado desta pesquisa com outros estudos na literatura, que utilizam compostos de origem natural ou nutracêuticos. Wei et al.<sup>(8)</sup> utilizou dosagens variadas de resveratrol de forma endovenosa para analisar o impacto deste tratamento na formação de aderências em modelo de abrasão cecal associado a abrasão do peritônio parietal acima do ceco e avaliando pelo método de Nair<sup>(10)</sup>. Dosagens médias e altas de resveratrol foram capazes de reduzir a formação de aderências. Celepli et al.<sup>(15)</sup> avaliou a aplicação diária por sonda nasogástrica de mel, pólen ou mel + pólen em modelo animal de abrasão cecal associado

com ressecção de seção do peritônio parietal sobre o ceco, com todos os três grupos obtendo redução estatisticamente significativa das aderências em relação ao grupo cirurgia. O uso do mel intraperitoneal foi avaliado por Emre<sup>(12)</sup> em modelo de abrasão cecal, apresentando redução estatisticamente significativa na formação das aderências. Aysan<sup>(64)</sup> também avaliou o uso de mel intraperitoneal em modelo animal de escarificação de íleo terminal associado a isquemia do seguimento escarificado com oclusão arterial transitória e avaliados conforme o método de Evans<sup>(62)</sup>, evidenciando relevância estatística na redução da formação de aderências. Lima<sup>(28)</sup> avaliou o impacto da administração oral de própolis verde na formação de aderências peritoneais com a implantação peritoneal de um disco de esponja inabsorvível. Este estudo comprovou a eficácia do própolis verde em reduzir a angiogênese, a deposição de colágeno e a formação de tecido fibrovascular dentro da esponja, sugerindo que substâncias naturais com atividade anti-inflamatória e antioxidante têm a capacidade de impactar positivamente com efeito benéfico na modulação do processo cicatricial do peritônio.

Tanto o modelo animal desenvolvido para indução de aderências peritoneais, quanto o método quantificável de avaliação e graduação dos achados macroscópicos das aderências peritoneais apresentaram-se como parte essencial para o desenvolvimento e a análise dos resultados desta pesquisa, existindo portanto a possibilidade de serem utilizados em futuras pesquisas com aderências peritoneais.

Ao se pesquisar sobre a prevenção da formação de aderências peritoneais pós-cirúrgicas, se persegue a total ausência de aderências em pacientes submetidos às cirurgias abdominais. A completa inibição da formação de aderências peritoneais é antifisiológica e potencialmente perigosa, visto que a capacidade de produzir aderências peritoneais frente a uma lesão peritoneal pode ter permitido a sobrevivência de alguns animais mais adaptados e, portanto, a seleção natural das espécies. Os que eram capazes de formar aderências tinham maiores chances de sobreviver a traumas que acometessem a cavidade peritoneal, assim como resistir a injúrias inflamatórias ou infecciosas, já que as aderências impediriam a disseminação do agente agressor por toda a cavidade peritoneal. Por isso a busca por substâncias que modulem, ao invés das que

anulem, o processo de formação das aderências peritoneais, pode ser a chave para reduzir a morbimortalidade causada por essa doença.

## 6 CONCLUSÃO

A grande quantidade de modelos animais criados para induzir a formação de aderências peritoneais acaba por impedir a homogeneização das pesquisas, associado ao fato de alguns modelos serem pouco eficientes na formação de aderências, ou induzindo-as através de traumas exagerados, danos ou procedimentos que nunca seriam utilizados na prática e que se adotados na clínica cirúrgica, seriam considerados má prática médica. O modelo animal de aderência peritoneal desenvolvido para este estudo é baseado em um procedimento cirúrgico adotado em humanos, utiliza os preceitos de minimização de danos e é capaz de induzir aderência em todos os animais submetidos ao modelo, causando pouca ou nenhuma morbidade / mortalidade ao animal, podendo ser amplamente replicado.

O método quantificável de graduação macroscópica das aderências mostrou ser mais eficaz em atribuir uma graduação condizente com as alterações encontradas no peritônio do que os outros métodos macroscópicos descritos na literatura pesquisada. Esse método permitiu que as alterações encontradas fossem quantificadas e comparadas obtendo a diferença estatisticamente significativa que correspondia aos achados macroscópicos.

O uso do própolis enteral na dosagem de 300 mg/kg/dia, embora tenha causado algum grau de redução das aderências, não alcançou significância estatística. O uso do própolis tópico, na forma intraperitoneal (300 mg/kg/dia), foi deletério, causando aumento da quantidade das aderências e alterações macroscópicas no fígado, comprovadas com significância estatística. Essas alterações podem ter sido ocasionadas por algum grau de toxicidade do própolis, causado por sua dosagem ou pela forma de aplicação adotada. Como não há paralelo na literatura apontando para possíveis efeitos tóxicos do própolis, são necessários novos estudos para elucidação destes achados. O própolis administrado de forma enteral na dosagem de 100 mg/kg/dia foi eficaz na redução da formação das aderências peritoneais pós cirúrgicas, com resultados significantes, abrindo caminho para novas pesquisas com esta substância na prevenção de aderências peritoneais pós-cirúrgicas, permitindo inclusive a idealização de pesquisas em humanos, visto sua milenar aplicabilidade e segurança.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- ASKARI, V. R. et al. Evaluation of the effects of Iranian propolis on the severity of post operational-induced peritoneal adhesion in rats. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 99, p. 346–353, mar. 2018.
- 2- ARUNG, W; MEURISSE M; DETRY O. Pathophysiology and prevention of postoperative peritoneal adhesions. *World Journal of Gastroenterology*, v. 17, n. 41, p. 4545-4553, 2011.
- 3- AWONUĞA, A. O. et al. Advances in the Pathogenesis of Adhesion Development: The Role of Oxidative Stress. *Reproductive Sciences*, v. 21, n. 7, p. 823–836, jul. 2014.
- 4- WEI, G. et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 prevents intra-abdominal adhesions by decreasing activity of peritoneal fibroblasts. *Drug Design, Development and Therapy*, p. 3083-3098, jun. 2015.
- 5- ROCCA, A. et al. Prevention and treatment of peritoneal adhesions in patients affected by vascular diseases following surgery: a review of the literature. *Open Medicine*, v. 11, n. 1, p. 106–114, 1 jan. 2016.
- 6- MAKARCHIAN, H. R. et al. The effectiveness of heparin, platelet-rich plasma (PRP), and silver nanoparticles on prevention of postoperative peritoneal adhesion formation in rats. *Acta Cirurgica Brasileira*, v. 32, n. 1, p. 22–27, jan. 2017.
- 7- KARAKAŞ, D. et al. Effect of platelet-rich plasma on postoperative peritoneal inflammation and adhesions. *Archives of Medical Science*, v. 17, n. 5, p. 1408-1413, apr. 2020.
- 8- WEI, G. et al. Effect of Resveratrol on the Prevention of Intra-Abdominal Adhesion Formation in a Rat Model. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 39, n. 1, p. 33–46, 2016.
- 9- COCCOLINI, F. et al. Peritoneal adhesion index (PAI): proposal of a score for the “ignored iceberg” of medicine and surgery. *World Journal of Emergency Surgery*, v. 8, n. 1, p. 6, 2013.
- 10- NAIR, S. K; BHAT, IK; AURORA, AL. Role of Proteolytic Enzyme in the Prevention of Postoperative Intraperitoneal Adhesions. *Archives of Surgery*, v. 108, n. 6, p. 849-853, jun. 1974.
- 11- MENZIES, D.; ELLIS, H. Intra-Abdominal Adhesions and Their Prevention by Topical Tissue Plasminogen Activator. *Journal of the Royal Society of Medicine*, v. 82, n. 9, p. 534–535, set. 1989.
- 12- EMRE, A. et al. Comparison of intraperitoneal honey and sodium hyaluronate-carboxymethylcellulose (Seprafilm) for the prevention of postoperative intra-abdominal adhesions. *Clinics*, v. 64, n. 4, p. 363-368, abr. 2009.
- 13- WHANG, S. H. et al. In Search of the Best Peritoneal Adhesion Model: Comparison of Different Techniques in a Rat Model. *Journal of Surgical Research*, v. 167, n. 2, p. 245–250, mai 2011.
- 14- LAUDER, C. I. W. et al. Use of a Modified Chitosan–Dextran Gel to Prevent Peritoneal Adhesions in a Rat Model. *Journal of Surgical Research*, v. 171, n. 2, p. 877–882, dez. 2011.
- 15- CELEPLI, S. et al. The effect of oral honey and pollen on postoperative intraabdominal adhesions. *The Turkish Journal of Gastroenterology*, v. 22, n. 1, p. 65–72, fev. 2011.
- 16- MAIS, V. Peritoneal adhesions after laparoscopic gastrointestinal surgery. *World Journal of Gastroenterology*, v. 20, n. 17, p. 4917-4925, 2014.
- 17- POEHNERT, D. et al. High Reproducibility of Adhesion Formation in Rat with Meso-Stitch Approximation of Injured Cecum and Abdominal Wall. *International Journal of Medical Sciences*, v. 12, n. 1, p. 1–6, 2015.

- 18- TSAI, J. M. et al. Neutrophil and monocyte kinetics play critical roles in mouse peritoneal adhesion formation. *Blood Advances*, v. 3, n. 18, p. 2713–2721, 13 set. 2019.
- 19- HARRIS, E.; MORGAN, R.; RODEHEAVER, G. Analysis of the kinetics of peritoneal adhesion formation in the rat and evaluation of potential antiadhesive agents. *Surgery*, v. 117, n. 6, p. 663–669, jun. 1995.
- 20- LORENZ, E. P. M. et al. Pathophysiology and Classification of Adhesions. *Peritoneal Adhesions*, p. 29–34, 1997.
- 21- KATADA, J.; SAITO, H.; OHASHI, A. Significance of Cyclooxygenase-2 Induced via p38 Mitogen-Activated Protein Kinase in Mechanical Stimulus-Induced Peritoneal Adhesion in Mice. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 313, n. 1, p. 286–292, dez. 2004.
- 22- THOMAS, J. W.; RHOADS, J.E. Adhesions resulting from removal of serosa from an area of bowel; failure of "oversewing" to lower incidence in the rat and the guinea pig. *Archives of Surgery*, v. 61, n. 3, p. 565-567, set. 1950.
- 23- WON SEO, K. et al. The protective effects of Propolis on hepatic injury and its mechanism. *Phytotherapy Research*, v. 17, n. 3, p. 250–253, 2003.
- 24- GUIMARÃES, N. S. S. et al. *Baccharis dracunculifolia*, the main source of green propolis, exhibits potent antioxidant activity and prevents oxidative mitochondrial damage. *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, n. 3-4, p. 1091–1097, mar. 2012.
- 25- MUJICA, V. et al. The Role of Propolis in Oxidative Stress and Lipid Metabolism: A Randomized Controlled Trial. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2017, p. 1–11, 2017.
- 26- NI, J. et al. The Neuroprotective Effects of Brazilian Green Propolis on Neurodegenerative Damage in Human Neuronal SH-SY5Y Cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2017, p. 1–13, 2017.
- 27- SILVA-CARVALHO, R.; BALTAZAR, F.; ALMEIDA-AGUIAR, C. Propolis: A Complex Natural Product with a Plethora of Biological Activities That Can Be Explored for Drug Development. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2015, p. 1–29, 2015.
- 28- LIMA, L. D. et al. Brazilian green propolis modulates inflammation, angiogenesis and fibrogenesis in intraperitoneal implant in mice. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 14, n. 1, mai 2014.
- 29- BERRETTA, A. A. et al. Propolis Standardized Extract (EPP-AF®), an Innovative Chemically and Biologically Reproducible Pharmaceutical Compound for Treating Wounds. *International Journal of Biological Sciences*, v. 8, n. 4, p. 512–521, 2012.
- 30- ROCHA, B. A. et al. Evaluation of a Propolis Water Extract Using a Reliable RP-HPLC Methodology and In Vitro and In Vivo Efficacy and Safety Characterisation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2013, p. 1–11, 2013.
- 31- TANG, J. et al. Peritoneal adhesions: Occurrence, prevention and experimental models. *Acta Biomaterialia*, v. 116, p. 84–104, out. 2020.
- 32- KASTELEIN, A. W. et al. Embryology, anatomy, physiology and pathophysiology of the peritoneum and the peritoneal vasculature. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 92, p. 27–36, ago. 2019.
- 33- WANG, Y. et al. Peritoneal fibrosis and epigenetic modulation. *Peritoneal Dialysis International: Journal of the International Society for Peritoneal Dialysis*, v. 41, n. 2, p. 168–178, jul. 2020.
- 34- MASOLA, V. et al. Fibrosis of Peritoneal Membrane as Target of New Therapies in Peritoneal Dialysis. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 9, p. 4831, jan. 2022.

- 35- CARMONA, R. et al. Mesothelial-mesenchymal transitions in embryogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 92, p. 37–44, ago. 2019.
- 36- DUAN, C. et al. UA promotes epithelial-mesenchymal transition in peritoneal mesothelial cells. *Molecular Medicine Reports*, v. 20, p. 2396-2402, jul. 2019.
- 37- YÁÑEZ-MÓ, M. et al. Peritoneal Dialysis and Epithelial-to-Mesenchymal Transition of Mesothelial Cells. *New England Journal of Medicine*, v. 348, n. 5, p. 403–413, jan. 2003.
- 38- CHU, J. Y. S. et al. miR-200c Prevents TGF- $\beta$ 1-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Fibrogenesis in Mesothelial Cells by Targeting ZEB2 and Notch1. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, v. 17, p. 78–91, set. 2019.
- 39- ISAZA-RESTREPO, A. et al. The Peritoneum: Beyond the Tissue – A Review. *Frontiers in Physiology*, v. 9, p. 738, jun. 2018.
- 40- ZWICKY, S. N.; STROKA, D.; ZINDEL, J. Sterile Injury Repair and Adhesion Formation at Serosal Surfaces. *Frontiers in Immunology*, v. 12, maio 2021.
- 41- DE OLIVEIRA, S.; ROSOWSKI, E. E.; HUTTENLOCHER, A. Neutrophil migration in infection and wound repair: going forward in reverse. *Nature Reviews Immunology*, v. 16, n. 6, p. 378–391, jun. 2016.
- 42- WONG, S. L. et al. Diabetes primes neutrophils to undergo NETosis, which impairs wound healing. *Nature Medicine*, v. 21, n. 7, p. 815–819, jun. 2015.
- 43- ROSALES, C. Neutrophil: A Cell with Many Roles in Inflammation or Several Cell Types? *Frontiers in Physiology*, v. 9, n. 113, fev. 2018.
- 44- BRINKMANN, V. et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 2004.
- 45- HEUER, A. et al. Therapeutic Targeting of Neutrophil Extracellular Traps Improves Primary and Secondary Intention Wound Healing in Mice. *Frontiers in Immunology*, v. 12, fev. 2021.
- 46- MAHAJAN, A. et al. Frontline Science: Aggregated neutrophil extracellular traps prevent inflammation on the neutrophil-rich ocular surface. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 105, n. 6, p. 1087–1098, abr. 2019.
- 47- JIMÉNEZ-ALCÁZAR, M. et al. Host DNases prevent vascular occlusion by neutrophil extracellular traps. *Science*, v. 358, n. 6367, p. 1202–1206, nov. 2017.
- 48- YIPP, B. G.; KUBES, P. NETosis: how vital is it? *Blood*, v. 122, n. 16, p. 2784–2794, out. 2013.
- 49- SCHAUER, C. et al. Aggregated neutrophil extracellular traps limit inflammation by degrading cytokines and chemokines. *Nature Medicine*, v. 20, n. 5, p. 511–517, maio 2014.
- 50- XU, J. et al. Extracellular histones are major mediators of death in sepsis. *Nature medicine*, v. 15, n. 11, p. 1318–1321, nov. 2009.
- 51- BOELTZ, S. et al. Neutrophil Extracellular Traps Open the Pandora's Box in Severe Malaria. *Frontiers in Immunology*, v. 8, jul. 2017.
- 52- BOETTCHER, M. et al. Therapeutic targeting of extracellular DNA improves the outcome of intestinal ischemic reperfusion injury in neonatal rats. *Scientific Reports*, v. 7, n. 1, nov. 2017.

- 53- LEPPKES, M. et al. Vascular occlusion by neutrophil extracellular traps in COVID-19. *EBioMedicine*, v. 58, p. 102925, ago. 2020.
- 54- FUCHS, T. A.; BRILL, A.; WAGNER, D. D. Neutrophil Extracellular Trap (NET) Impact on Deep Vein Thrombosis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, v. 32, n. 8, p. 1777–1783, ago. 2012.
- 55- LEPPKES, M. et al. Externalized decondensed neutrophil chromatin occludes pancreatic ducts and drives pancreatitis. *Nature Communications*, v. 7, n. 1, mar. 2016.
- 56- MUÑOZ, L. E. et al. Neutrophil Extracellular Traps Initiate Gallstone Formation. *Immunity*, v. 51, n. 3, p. 443-450.e4, set. 2019.
- 57- SCHAPHER, M. et al. Neutrophil Extracellular Traps Promote the Development and Growth of Human Salivary Stones. *Cells*, v. 9, n. 9, p. 2139, set. 2020.
- 58- ACKERMANN, M. et al. Patients with COVID-19: in the dark-NETs of neutrophils. *Cell Death and Differentiation*, v. 28, n. 11, p. 3125–3139, nov. 2021.
- 59- MARTINEZ, F. O.; GORDON, S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports*, v. 6, mar. 2014.
- 60- TORRES, K. et al. TGF- $\beta$  and inflammatory blood markers in prediction of intraperitoneal adhesions. *Advances in Medical Sciences*, v. 63, n. 2, p. 220–223, set. 2018.
- 61- WEI, G. et al. Keratinocyte Growth Factor Combined with a Sodium Hyaluronate Gel Inhibits Postoperative Intra-Abdominal Adhesions. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, n. 10, p. 1611, set. 2016.
- 62- EVANS, D. M. et al. Dose dependency and wound healing aspects of the use of tissue plasminogen activator in the prevention of intra-abdominal adhesions. *The American Journal of Surgery*, v. 165, n. 2, p. 229–232, fev. 1993.
- 63- SIES, H.; JONES, D. P. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 21, n. 7, p. 363-383, mar. 2020.
- 63- AYSAN, E. et al. The role of intra-peritoneal honey administration in preventing post-operative peritoneal adhesions. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, v. 104, n. 2, p. 152–155, set. 2002.
- 64- Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa. Disponível em: <<https://www.academia.org.br/nossa-lingua/busca-no-vocabulario>>. Acesso em: 11 dez 2022.
- 65- SCHANAIDER, A. et al. Exogenous pulmonary surfactant prevents the development of intra-abdominal adhesions in rats. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, v. 20, n. 4, p. 632–643, fev. 2016.
- 66- KRAEMER, B. et al. Standardised Models for Inducing Experimental Peritoneal Adhesions in Female Rats. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 1–8, 2014.
- 67- HOFFMANN, N. E. et al. Choice of Hemostatic Agent Influences Adhesion Formation in a Rat Cecal Adhesion Model. *Journal of Surgical Research*, v. 155, n. 1, p. 77–81, jul. 2009.
- 68- PARDELA, M. et al. Wpływ etanolowego ekstraktu propolisu na tworzenie się zrostów otrzewnych w warunkach doświadczalnych [Effect of an ethanol extract of propolis on the formation of experimental peritoneal adhesions]. *Przegl Lek*, v.41, n.12, p. 729-731, 1984.

69- Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal. RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 25. Brasília: CONCEA; 2015. 33p.

70- DE SOUSA, J. P. B. et al. A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science*, v. 30, n. 16, p. 2656–2665, nov. 2007.

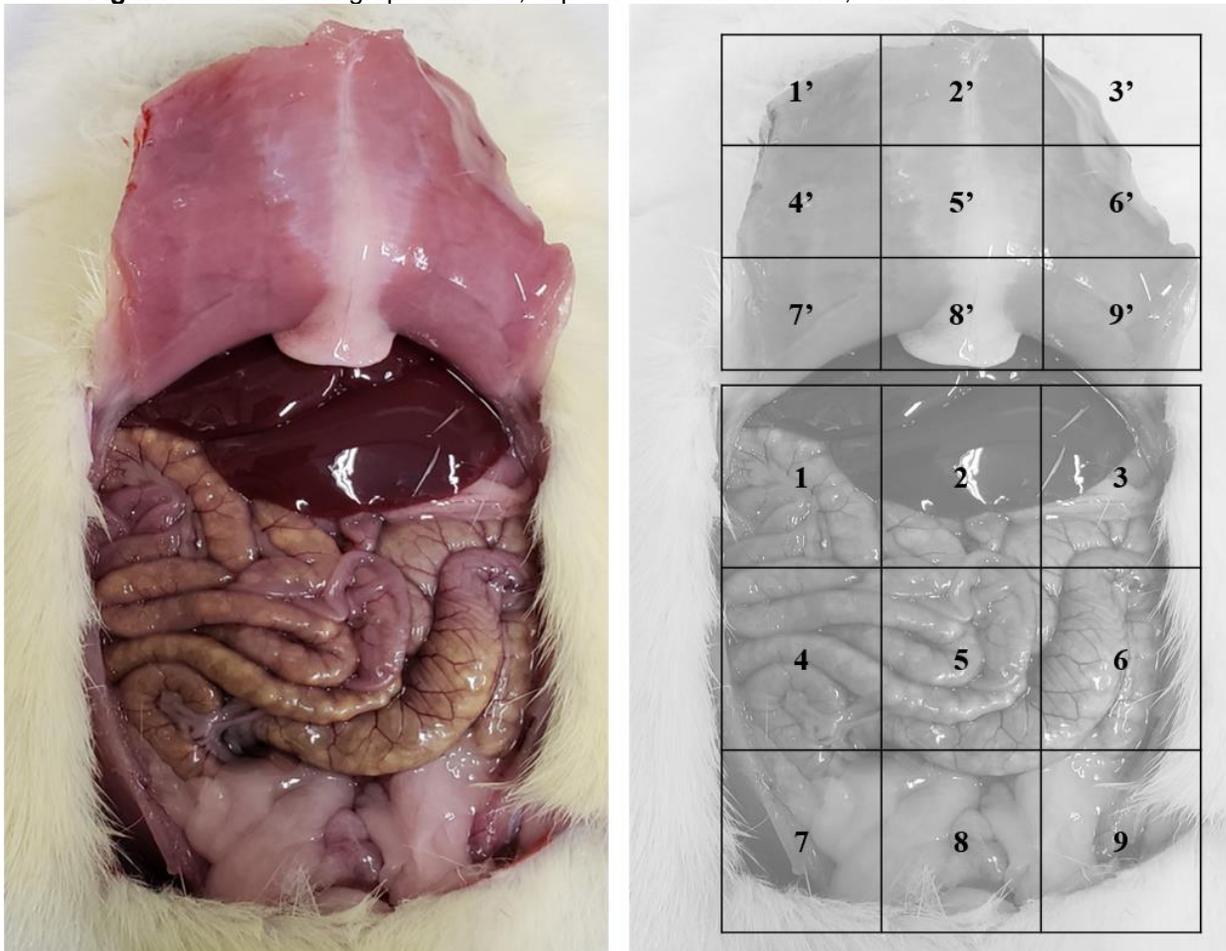
## APÊNDICES

### APÊNDICE A - RELATÓRIO DE CÁLCULOS DO RESULTADO

#### 1 Grupo Controle

Os seis animais do grupo controle não manifestaram nenhum sinal de doença e não foram encontradas aderências peritoneais à necropsia (figura 10). Todos os animais do grupo pontuaram com 0 pontos em todas as 3 escalas de graduação avaliadas (tabelas 4, 6 e 8) do texto.

**Figura 10** - Ratos do grupo controle, aspecto anatômico normal, sem aderências.



Fonte: Autoria própria.

## 2 Grupo Simulação (Sham)

Os seis animais do grupo simulação (sham) evoluíram clinicamente bem até o 14º dia de pós-operatório, quando foi realizada a eutanásia. Durante a necropsia três animais apresentavam aderências peritoneais e três animais apresentavam-se sem aderências.

### 2.1 Grupo Simulação (Sham) - Rato 01

O rato 01 (figura 11) deste grupo não apresentava aderências peritoneais, por isso foi graduado com zero pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 11 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Não apresentava aderências porém haviam alterações morfológicas nos quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: 1) alteração no aspecto da estrutura, 2) neovascularização e 3) corpo estranho.

2': TA x IA = 0 / AG = 3

5': TA x IA = 0 / AG = 3

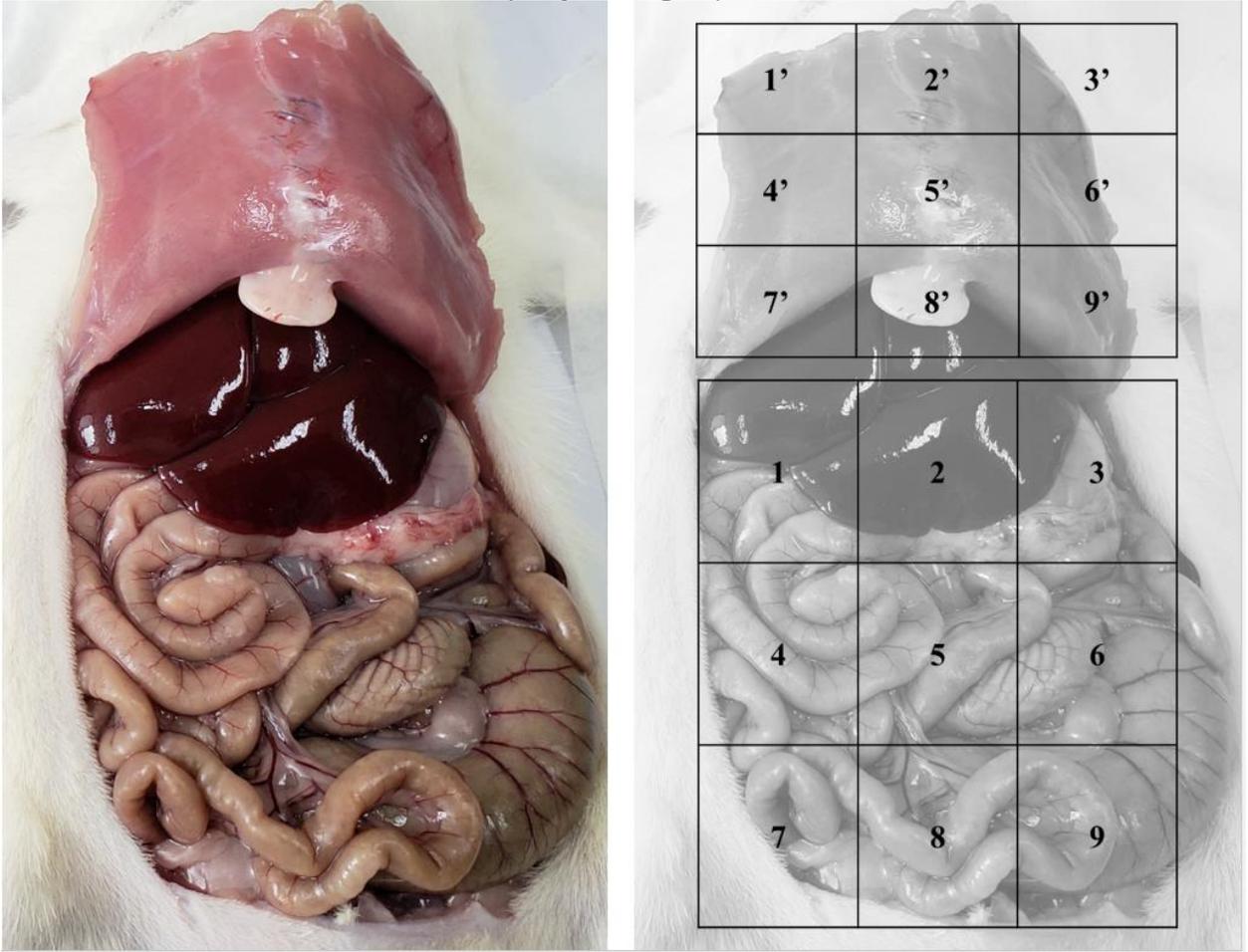
8': TA x IA = 0 / AG = 3

Abdome: Não apresentava aderências porém haviam alterações morfológicas nos quadrantes 2 e 3, que apresentavam neovascularização.

2: TA x IA = 0 / AG = 1

3: TA x IA = 0 / AG = 1

**Figura 11** - Rato 1 do grupo simulação (sham), sem aderências, porém com alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



**Fonte:** Autoria própria.

## 2.2 Grupo Simulação (Sham) - Rato 02

O rato 02 (figura 12) deste grupo não apresentava aderências peritoneais, por isso foi graduado com zero pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 10 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Não apresentava aderências porém haviam alterações morfológicas nos quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: 1) alteração no aspecto da estrutura, 2) neovascularização e 3) corpo estranho.

2': TA x IA = 0 / AG = 3

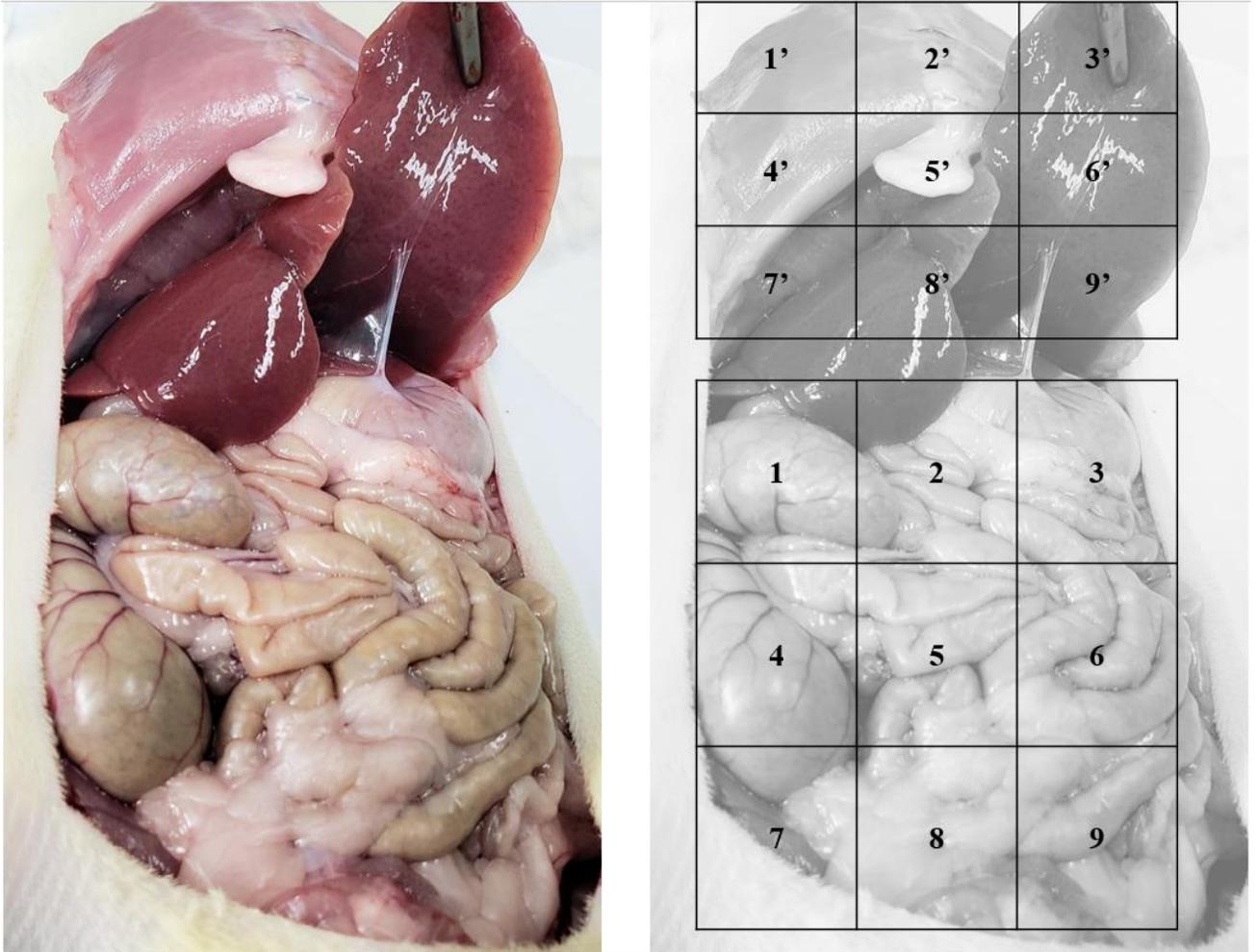
5': TA x IA = 0 / AG = 3

8': TA x IA = 0 / AG = 3

Abdome: Não apresentava aderências porém havia alteração morfológica no quadrante 3, que apresentava neovascularização.

3: TA x IA = 0 / AG = 1

**Figura 12:** Rato 2 do grupo simulação (sham), sem aderências, porém com alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



**Fonte:** Autoria própria.

### 2.3 Grupo Simulação (Sham) - Rato 03

O rato 03 (figura 13) deste grupo apresentava aderências peritoneais entre o epíplon e a parede abdominal, em cicatriz mediana e entre a gordura epididimal e a parede abdominal em cicatriz mediana, sendo graduado com 02 (dois) pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 19 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Presença de aderência entre a parede abdominal e a gordura epididimal no quadrante 5', agravada com neovascularização, corpo estranho e mudança no aspecto da estrutura e de aderência entre a parede abdominal e o epíplon no quadrante 8', agravada com neovascularização, corpo estranho e mudança no aspecto da estrutura, associado as alterações nos quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: 1) alteração no aspecto da estrutura, 2) neovascularização e 3) corpo estranho.

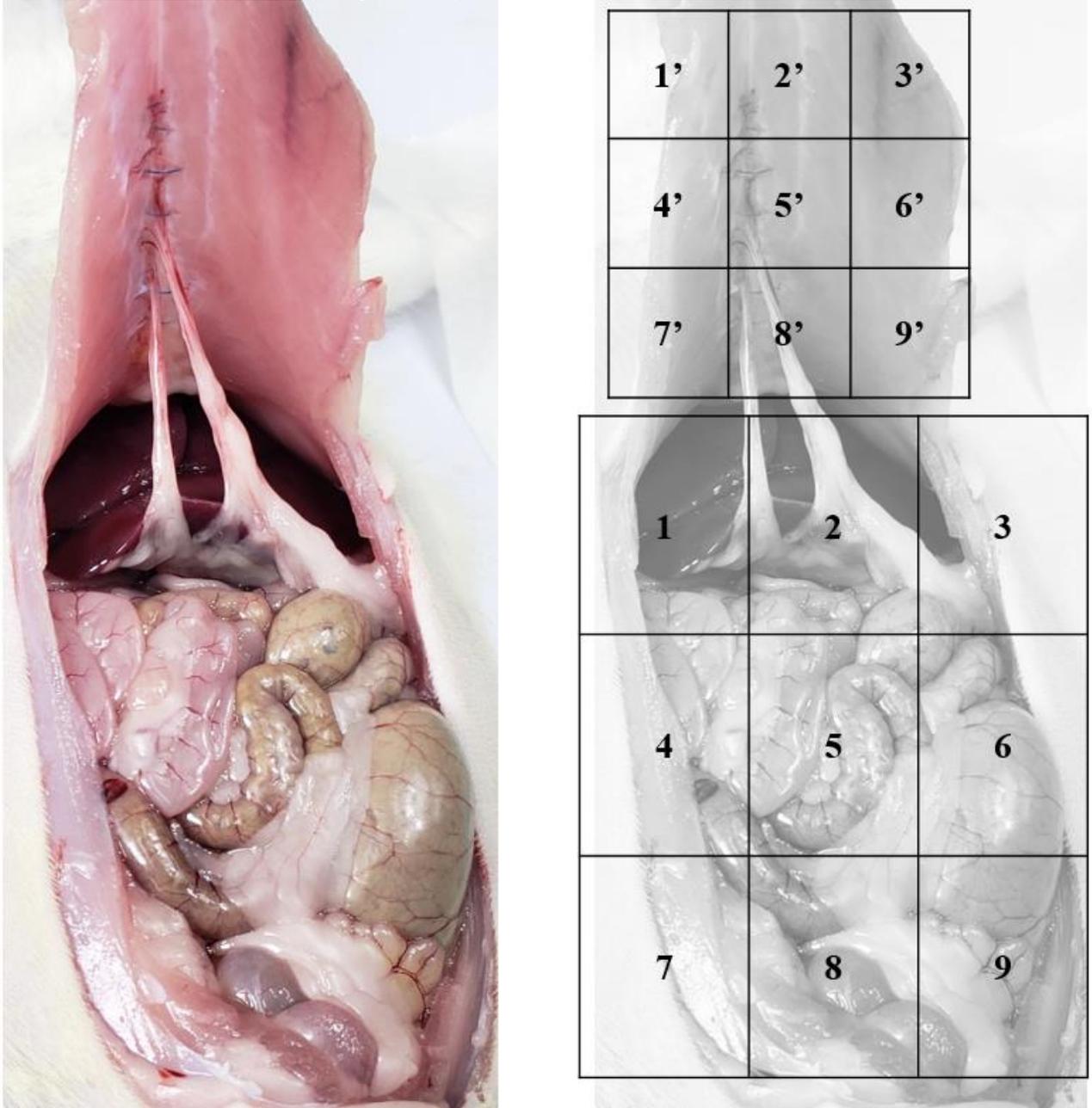
$$2': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

$$5': TA \times IA = 2 \times 1 + 3 / AG = 3$$

$$8': TA \times IA = 2 \times 1 + 3 / AG = 3$$

Abdome: Sem alterações.

**Figura 13:** Rato 3 do grupo simulação (sham), com aderências entre o epíplon e a parede abdominal em cicatriz mediana e entre a gordura epididimal e a parede abdominal em cicatriz mediana.



**Fonte:** Autoria própria.

#### 2.4 Grupo Simulação (Sham) - Rato 04

O rato 04 (figura 14) deste grupo apresentava aderências peritoneais entre a gordura epididimal e a parede abdominal em cicatriz mediana e do fígado à parede abdominal, através de banda de aderência em formato laminar, sem união direita do órgão à parede, aderindo à cicatriz mediana, sendo graduado com 02 (dois) pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 22 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Presença de aderência entre a parede abdominal e a gordura epididimal no quadrante 5', de formato laminar, agravada com corpo estranho e mudança no aspecto da estrutura e de aderência entre a parede abdominal e o fígado no quadrante 8', através de banda de aderência em formato laminar, sem união direita do órgão à parede, agravada com neovascularização, corpo estranho e mudança no aspecto da estrutura, associado as alterações nos quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: 1) alteração no aspecto da estrutura, 2) neovascularização e 3) corpo estranho.

$$2': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

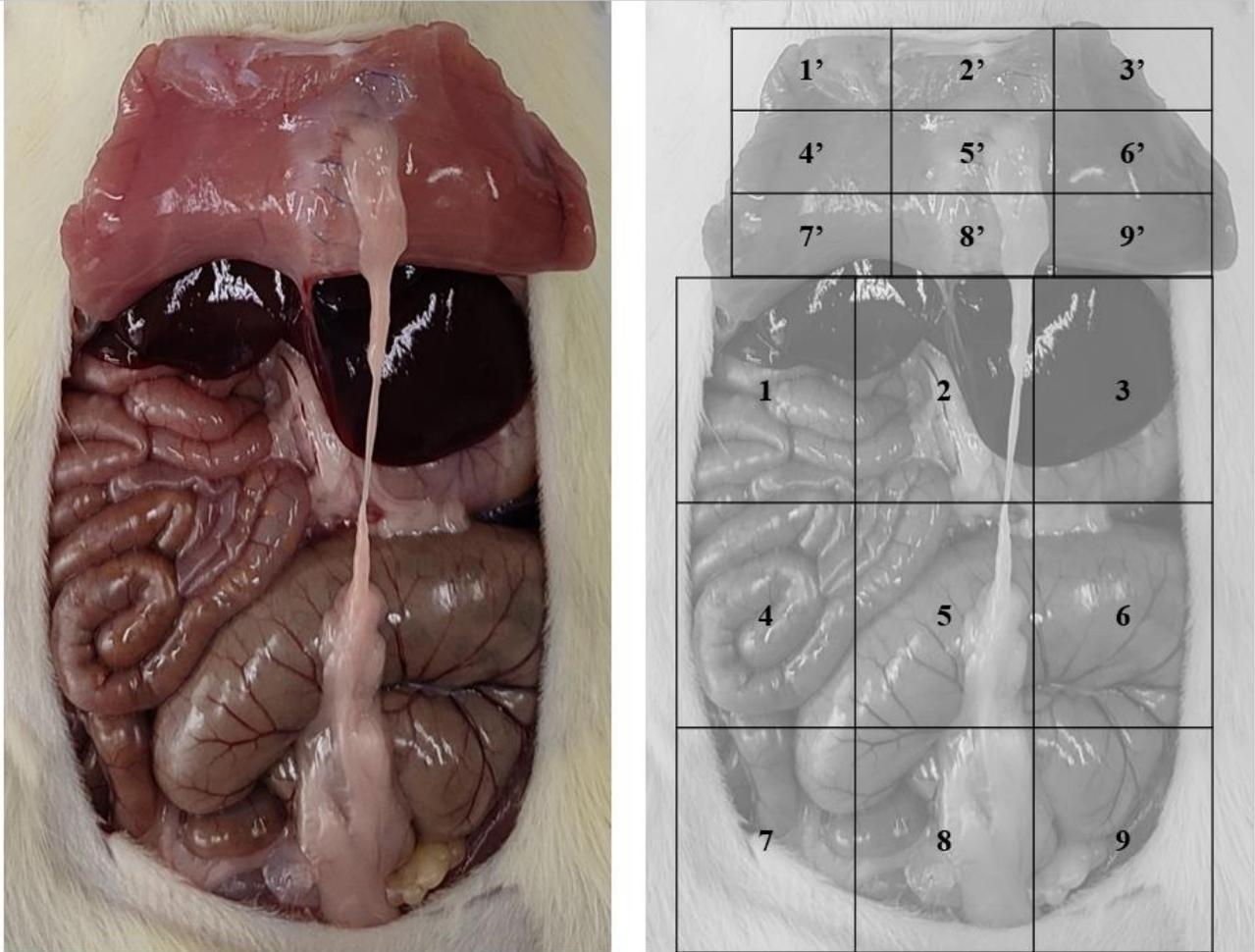
$$5': TA \times IA = 2 \times 2 + 2 / AG = 3$$

$$8': TA \times IA = 2 \times 2 + 3 / AG = 3$$

Abdome: Não apresentava aderências porém haviam alterações morfológicas no quadrante 2, que apresentava neovascularização

$$2: TA \times IA = 0 / AG = 1$$

**Figura 14:** Rato 4 do grupo simulação (sham), com aderências entre a gordura epididimal e a parede abdominal em cicatriz mediana e entre o fígado e a parede abdominal, em cicatriz mediana, por banda laminar de aderência sem adesão direta do órgão à parede.



**Fonte:** Autoria própria.

## 2.5 Grupo Simulação (Sham) - Rato 05

O rato 05 (figura 15) deste grupo apresentava aderência peritoneal entre a gordura epididimal e a parede abdominal em cicatriz mediana, sendo graduado com 2 (dois) pontos na escala de Evans<sup>(62)</sup> e com 01 (um) ponto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 14 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Presença de aderência entre a parede abdominal e a gordura epididimal no quadrante 8', de formato puntiforme, agravada com corpo estranho e mudança no aspecto da estrutura, associado as alterações nos quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: 1) alteração no aspecto da estrutura, 2) neovascularização e 3) corpo estranho.

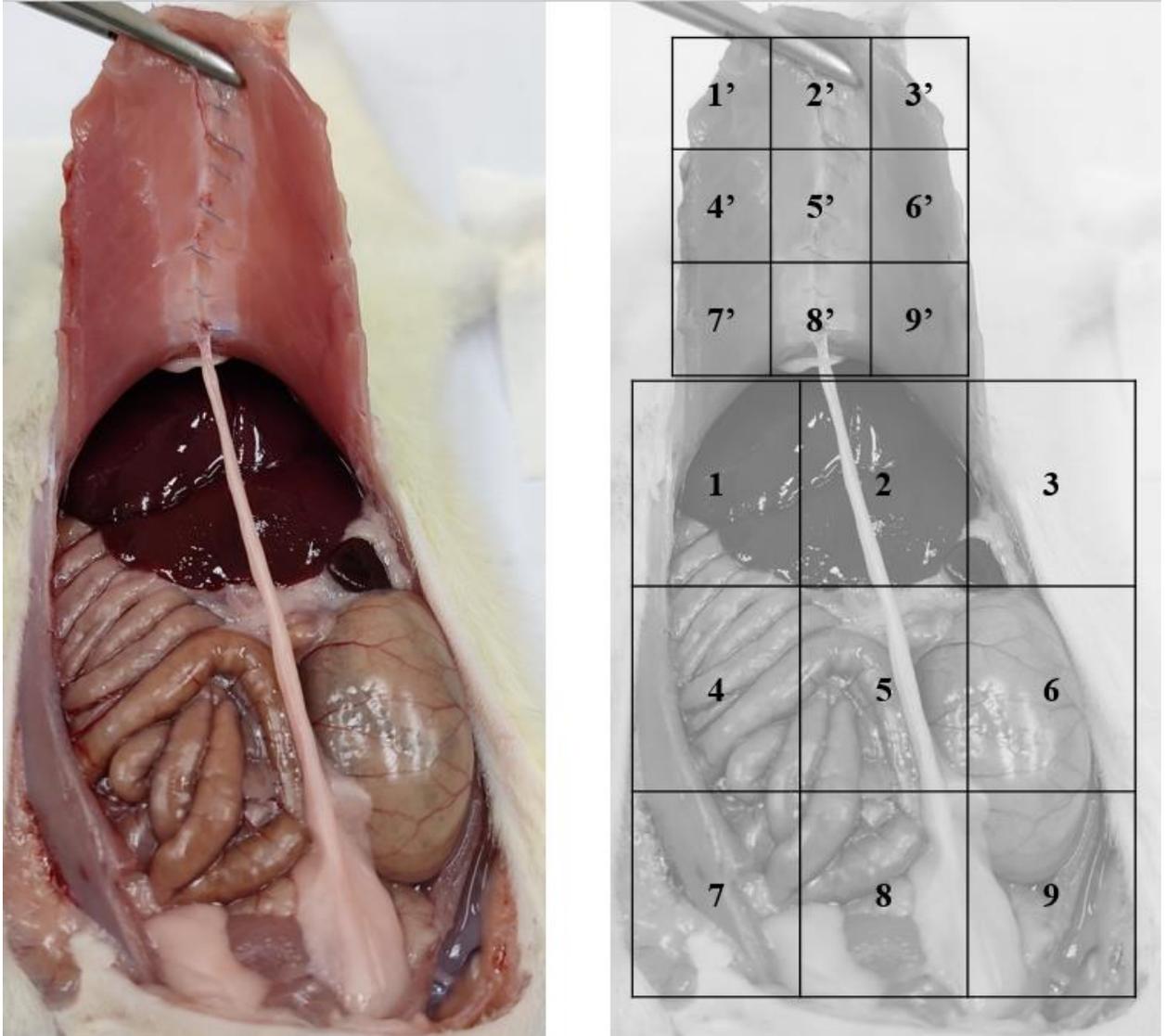
$$2': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

$$5': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

$$8': TA \times IA = 2 \times 1 + 3 / AG = 3$$

Abdome: Sem alterações.

**Figura 15:** Rato 5 do grupo simulação (sham), com aderência entre a gordura epididimal e a parede abdominal em cicatriz mediana.



**Fonte:** Autoria própria.

## 2.6 Grupo Simulação (Sham) - Rato 06

O rato 06 (figura 16) deste grupo não apresentava aderências peritoneais, por isso foi graduado com zero pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 8 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Não apresentava aderências porém haviam alterações morfológicas nos quadrantes 2' e 5' que apresentavam: 1) alteração no aspecto da estrutura, 2) neovascularização e 3) corpo estranho e no quadrante 8', que apresentava: 1) alteração no aspecto da estrutura e 2) corpo estranho.

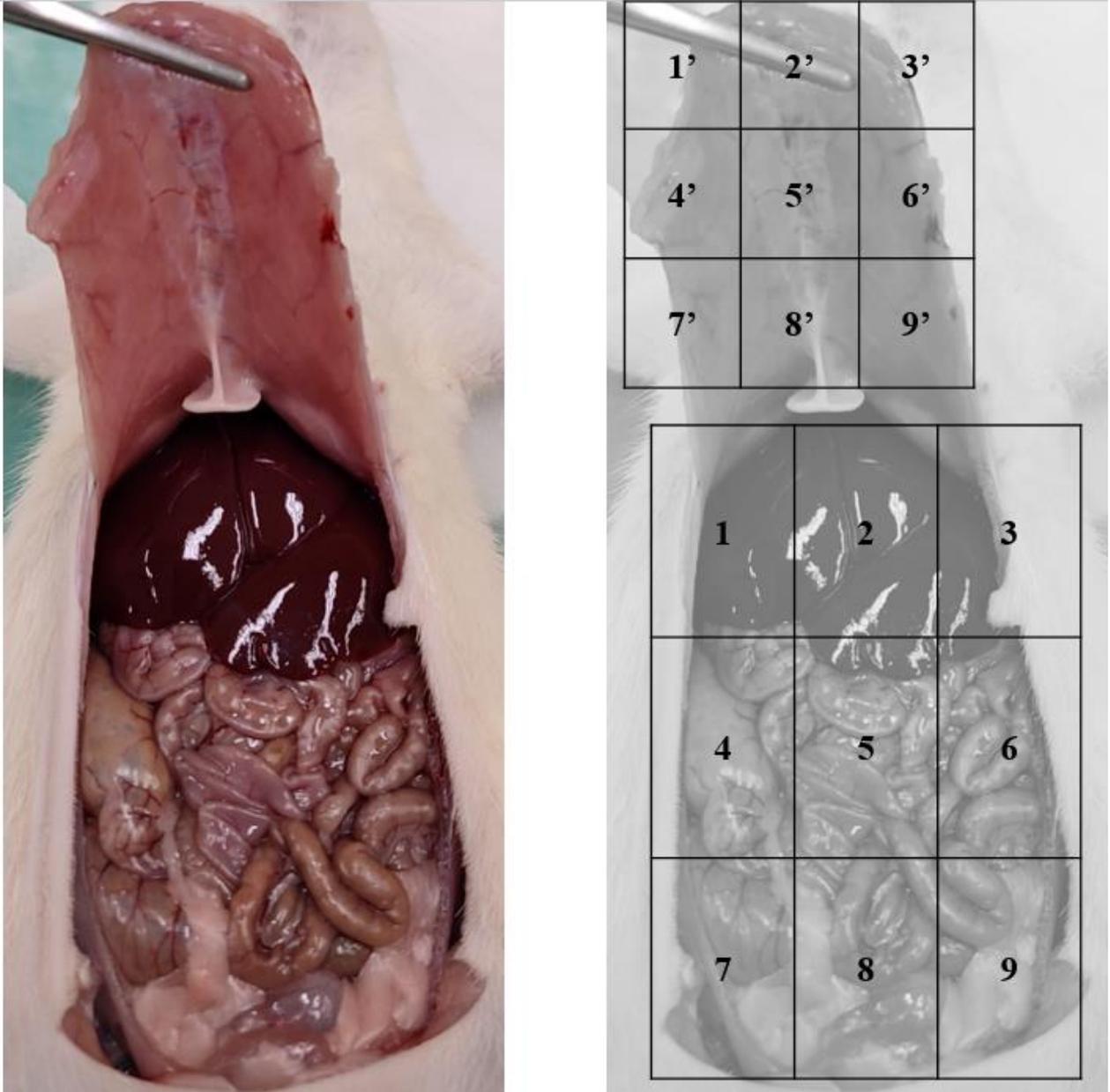
2': TA x IA = 0 / AG = 3

5': TA x IA = 0 / AG = 3

8': TA x IA = 0 / AG = 2

Abdome: Sem alterações.

**Figura 16:** Rato 6 do grupo simulação (sham), sem aderências, porém com alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



Fonte: Autoria própria.

### 3 Grupo Cirurgia

Os seis animais do grupo cirurgia (gastrotomia seguida de gastrorrafia) evoluíram clinicamente bem até o 14º dia de pós-operatório, quando foi realizada a eutanásia. Durante a necropsia todos os animais apresentavam aderências firmes entre o estômago, o fígado e o epíplon.

#### 3.1 Grupo Cirurgia - Rato 01

O rato 01 (figura 17) deste grupo não apresentava aderências peritoneais acometendo a parede abdominal, porém no abdome haviam aderências firmes entre o estômago, o fígado e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 48 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Não apresentava aderências porém haviam alterações morfológicas nos quadrantes 2' que apresentava 1) alteração no aspecto da estrutura e 2) corpo estranho, 4' que apresentava alteração no aspecto da estrutura e nos quadrantes 5' e 8', que apresentavam: 1) alteração no aspecto da estrutura, 2) neovascularização e 3) corpo estranho.

2': TA x IA = 0 / AG = 2

4': TA x IA = 0 / AG = 1

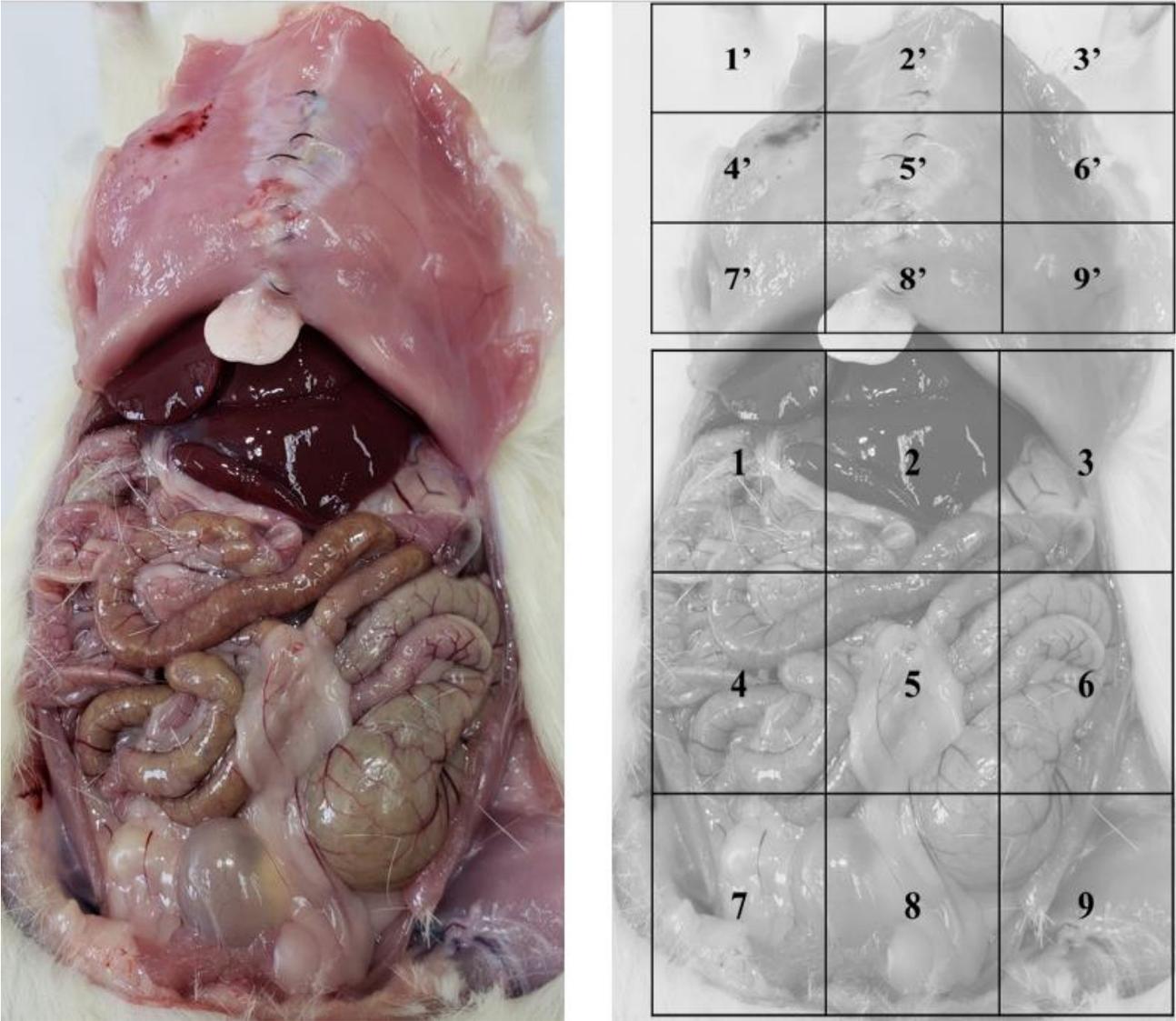
5': TA x IA = 0 / AG = 3

8': TA x IA = 0 / AG = 3

Abdome: No quadrante 1, presença de aderência entre o epíplon e a borda à direita do lobo hepático, que acometia menos da metade da superfície do fígado neste quadrante, agravada com neovascularização. Nos quadrantes 2 e 3, haviam aderências entre o fígado, o estômago e o epíplon agravados com mudança no aspecto da estrutura e corpo estranho, associado as alterações morfológicas nestes quadrantes apresentando mudança no aspecto da estrutura e corpo estranho.

- 1: TA x IA = 2 x 3 + 1 / AG = 0
- 2: TA x IA = 3 x 4 + 2 / AG = 2
- 3: TA x IA = 3 x 4 + 2 / AG = 2

**Figura 17:** Rato 1 do grupo cirurgia, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon. Aderência entre o epíplon e o fígado fora da área de sutura gástrica, associado as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



Fonte: Autoria própria.

### 3.2 Grupo Cirurgia - Rato 02

O rato 02 (figura 18) deste grupo apresentava aderências peritoneais acometendo a parede abdominal em quadrante superior esquerdo, associadas a aderências firmes entre o estômago, o fígado e o epíplon, sendo graduado com três pontos na escala de Evans<sup>(62)</sup> e quatro pontos na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 55 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Presença de aderência entre a parede abdominal, em quadrante superior esquerdo, e o aglomerado que englobava o fígado, o estômago e o epíplon, de aspecto laminar, agravado com neovascularização, associadas a alterações morfológicas nos quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: 1) alteração no aspecto da estrutura e 2) corpo estranho.

$$2': TA \times IA = 0 / AG = 2$$

$$5': TA \times IA = 0 / AG = 2$$

$$8': TA \times IA = 0 / AG = 2$$

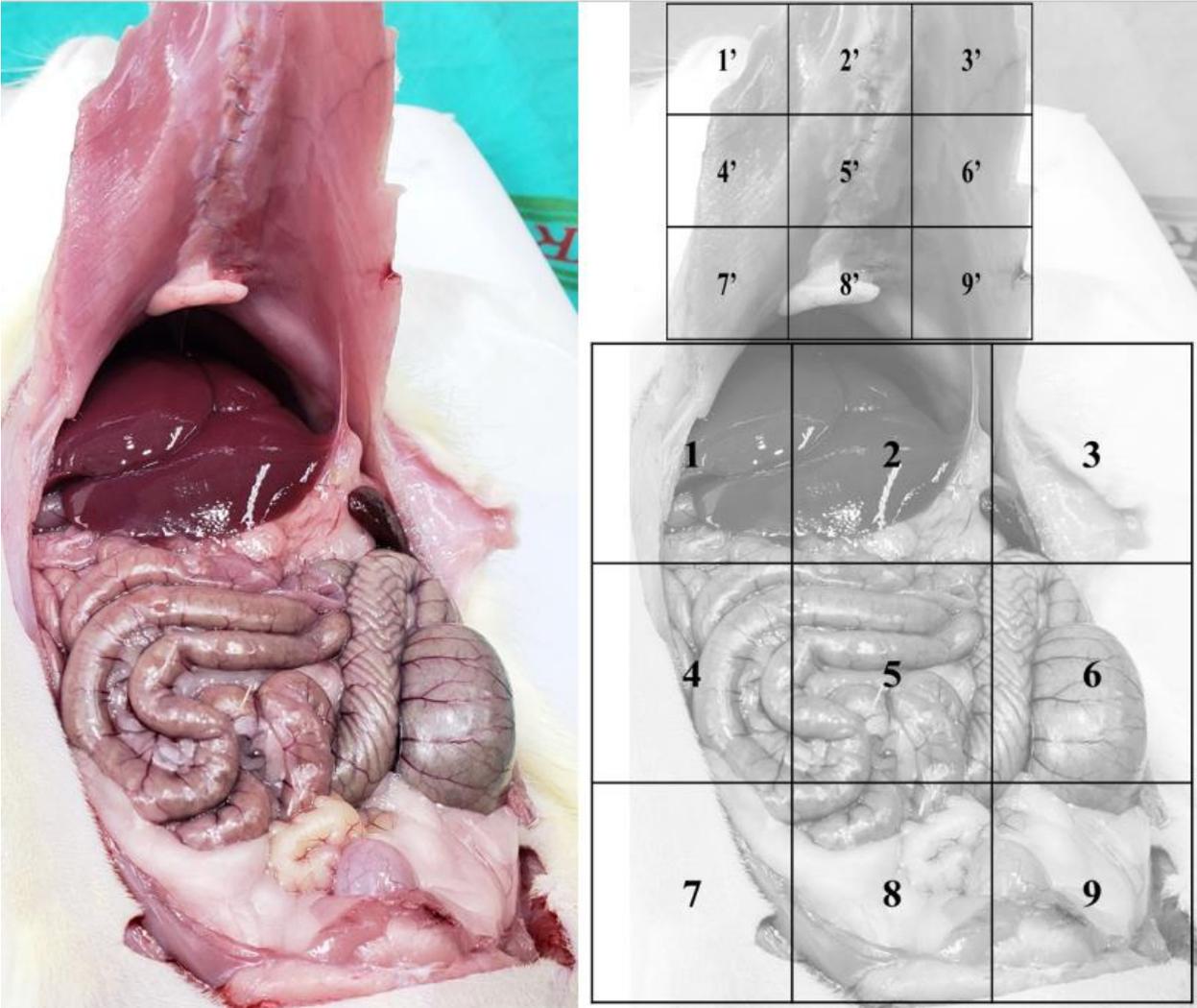
$$9': TA \times IA = 4 \times 2 + 1 / AG = 0$$

Abdome: Presença de aderências entre o fígado, o estômago e o epíplon, no quadrante 2 que ultrapassava metade da superfície do órgão, agravada com neovascularização e alteração no aspecto da estrutura e em quadrante 3 que ultrapassava a superfície do fígado, acometendo a parede abdominal, agravada com neovascularização e alteração no aspecto da estrutura, associadas a alterações morfológicas nestes quadrantes apresentando mudança no aspecto da estrutura e neovascularização.

$$2: TA \times IA = 3 \times 4 + 2 / AG = 2$$

$$3: TA \times IA = 4 \times 5 + 2 / AG = 2$$

**Figura 18:** Rato 2 do grupo cirurgia, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon. Aderência entre a parede abdominal e aglomerado de estruturas acometendo o fígado, o estômago e o epíplon, em quadrante superior esquerdo, associado as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



Fonte: Autoria própria.

### 3.3 Grupo Cirurgia - Rato 03

O rato 03 (figura 19) deste grupo apresentava volumosa hérnia incisional totalmente recoberta com aderência de gordura epididimal, que apresentava perda de domicílio localizando-se exclusivamente em região herniária, associadas a aderências peritoneais acometendo a parede abdominal em cicatriz mediana e de aderências firmes entre o estômago, o fígado e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 74 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Presença de volumosa hérnia incisional que foi totalmente recoberta com a gordura epididimal, que apresentava perda de domicílio localizando-se exclusivamente em região herniária, aderência entre a parede abdominal e a gordura epididimal, de aspecto puntiforme, agravado com neovascularização, alteração no aspecto da estrutura e corpo estranho associadas a alterações morfológicas nos quadrantes 2', que apresentava: 1) alteração no aspecto da estrutura e 2) corpo estranho e quadrantes 5' e 8', que apresentavam: 1) alteração no aspecto da estrutura, 2) neovascularização e 3) corpo estranho.

$$2': TA \times IA = 2 \times 3 + 2 / AG = 2$$

$$5': TA \times IA = 2 \times 3 + 3 / AG = 3$$

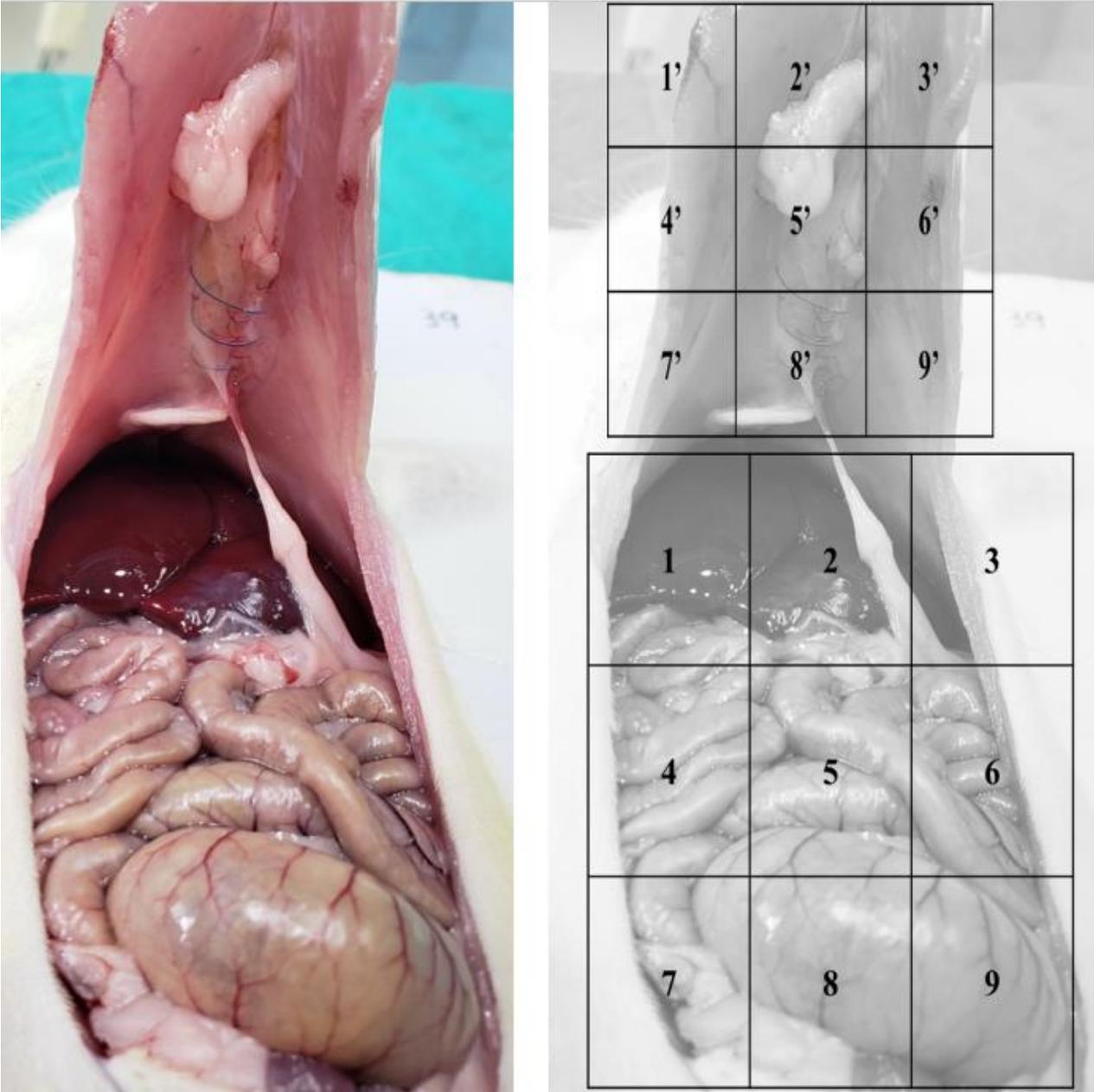
$$8': TA \times IA = 2 \times 1 + 3 / AG = 3$$

Abdome: Presença de aderências entre o fígado, o estômago, o epíplon e a gordura epididimal, no quadrante 2 que ultrapassava metade da superfície do órgão, agravada com neovascularização e alteração no aspecto da estrutura e em quadrante 3 que ultrapassava a superfície do fígado, agravada com neovascularização e alteração no aspecto da estrutura, associadas a alterações morfológicas nestes quadrantes apresentando mudança no aspecto da estrutura e neovascularização.

$$2: TA \times IA = 4 \times 4 + 2 / AG = 2$$

$$3: TA \times IA = 4 \times 5 + 2 / AG = 2$$

**Figura 19:** Rato 3 do grupo cirurgia, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago, o epíplon e a gordura epididimal. Aderência entre a parede abdominal e a gordura epididimal, tanto na cicatriz mediana como em toda extensão da hérnia incisional, associado as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



**Fonte:** Autoria própria.

### 3.4 Grupo Cirurgia - Rato 04

O rato 04 deste grupo não possui imagens por danos irreversíveis aos arquivos de imagem, porém todas as alterações foram anotadas e classificadas. Apresentava aderências peritoneais acometendo a parede abdominal em quadrante superior esquerdo, associadas a aderências firmes entre o estômago, o fígado, o epíplon e a gordura epididimal, sendo graduado com três pontos na escala de Evans<sup>(62)</sup> e quatro pontos na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 67 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Presença de aderência entre a parede abdominal no quadrante superior esquerdo e o aglomerado que englobava o fígado, o estômago, o epíplon e a gordura epididimal, com fusão deste aglomerado à parede abdominal em mais da metade do quadrante, agravado com neovascularização e mudança no aspecto da estrutura, associadas a alterações morfológicas nos quadrantes 2', que apresentava: 1) alteração no aspecto da estrutura e 2) corpo estranho e quadrantes 5' e 8', que apresentavam: 1) alteração no aspecto da estrutura, 2) neovascularização e 3) corpo estranho.

$$2': TA \times IA = 0 / AG = 2$$

$$5': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

$$8': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

$$9': TA \times IA = 4 \times 4 + 2 / AG = 0$$

Abdome: Presença de aderências entre o fígado, o estômago e o epíplon, no quadrante 2 que ultrapassava metade da superfície do órgão, agravada com neovascularização e alteração no aspecto da estrutura e presença de aderências entre o fígado, o estômago, o epíplon e a gordura epididimal, em quadrante 3 que ultrapassava a superfície do fígado, agravada com neovascularização e alteração no aspecto da estrutura (alteração sugestiva de abscesso hepático), associadas a alterações morfológicas nestes quadrantes apresentando mudança no aspecto da estrutura e neovascularização.

$$2: TA \times IA = 3 \times 4 + 2 / AG = 3$$

$$3: TA \times IA = 4 \times 5 + 2 / AG = 2$$

### 3.5 Grupo Cirurgia - Rato 05

O rato 05 deste grupo não possui imagens por danos irreversíveis aos arquivos de imagem, porém todas as alterações foram anotadas e classificadas. Apresentava aderências peritoneais acometendo a parede abdominal e o epíplon, em cicatriz mediana, associadas a aderências firmes entre o estômago, o fígado e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 48 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Presença de aderência entre a cicatriz mediana e o epíplon, agravada com corpo estranho, neovascularização e mudança no aspecto da estrutura, associadas a alterações morfológicas nos quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: 1) alteração no aspecto da estrutura, 2) neovascularização e 3) corpo estranho.

$$2': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

$$5': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

$$8': TA \times IA = 2 \times 2 + 3 / AG = 3$$

Abdome: Presença de aderências entre o fígado, o estômago e o epíplon, que ultrapassava metade da superfície do órgão, agravada com neovascularização e alteração no aspecto da estrutura, associadas a alterações morfológicas nestes quadrantes apresentando mudança no aspecto da estrutura e neovascularização.

$$2: TA \times IA = 3 \times 4 + 2 / AG = 2$$

$$3: TA \times IA = 3 \times 4 + 2 / AG = 2$$

### 3.6 Grupo Cirurgia - Rato 06

O rato 06 (figura 20) deste grupo apresentava aderências peritoneais acometendo a parede abdominal em quadrante superior esquerdo, associadas a aderências firmes entre o estômago, o fígado, o epíplon e a gordura epididimal, sendo graduado com três pontos na escala de Evans<sup>(62)</sup> e quatro pontos na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 62 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Presença de aderência entre a parede abdominal, em quadrante superior esquerdo e o diafragma, e o aglomerado que englobava o fígado, o estômago, o epíplon e a gordura epididimal, com fusão deste aglomerado à parede em menos da metade do quadrante, agravado com neovascularização e mudança no aspecto da estrutura, associadas a alterações morfológicas nos quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: 1) alteração no aspecto da estrutura, 2) neovascularização e 3) corpo estranho.

$$2': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

$$5': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

$$8': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

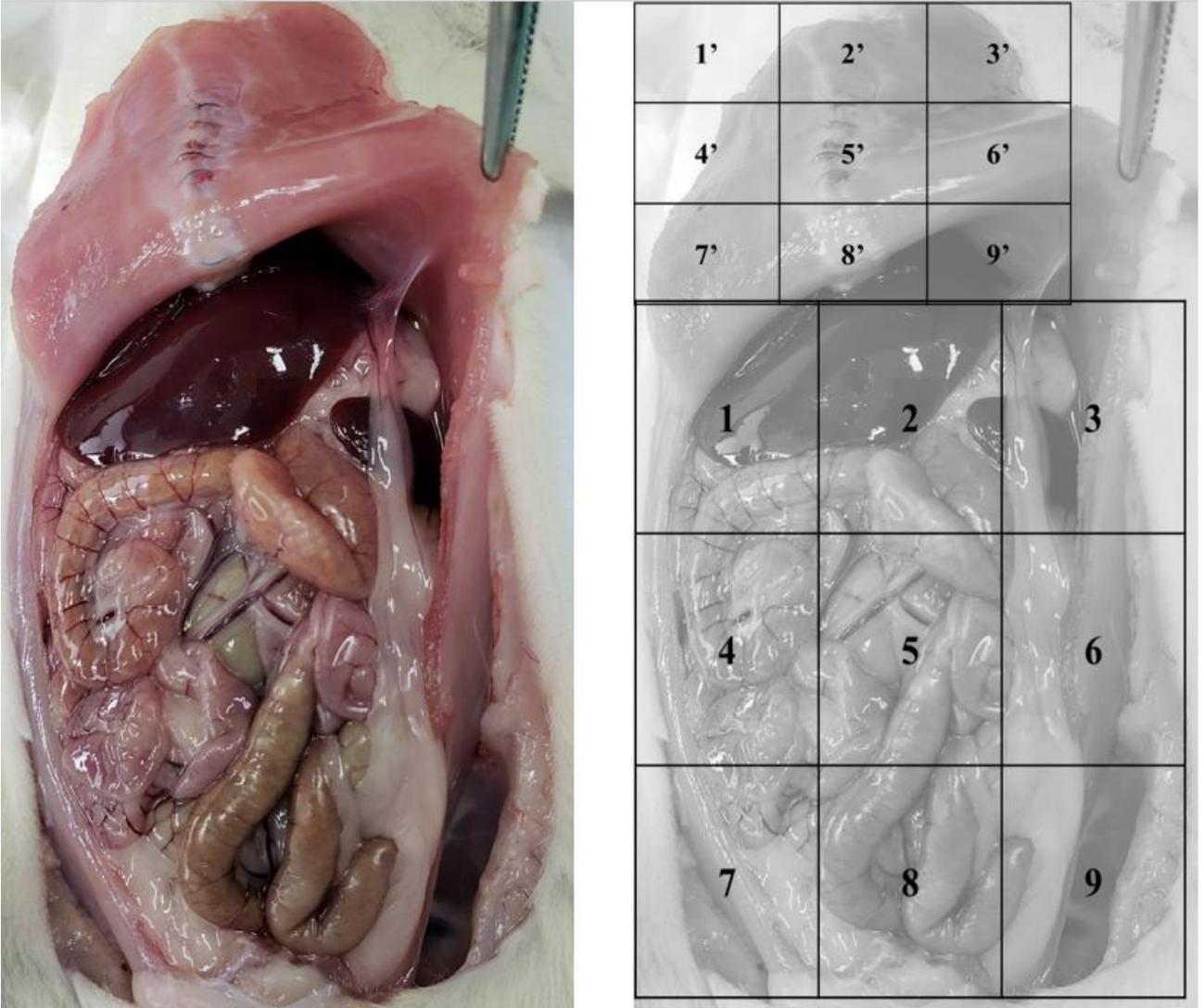
$$12': TA \times IA = 4 \times 3 + 2 / AG = 0$$

Abdome: Presença de aderências entre o fígado, o estômago e o epíplon, no quadrante 2 em menos da metade da superfície do órgão, agravada com corpo estranho, neovascularização e alteração no aspecto da estrutura e presença de aderências entre o fígado, o estômago, o epíplon e a gordura epididimal, em quadrante 3 que ultrapassava a superfície do fígado, agravada com neovascularização e alteração no aspecto da estrutura, associadas a alterações morfológicas nestes quadrantes apresentando mudança no aspecto da estrutura e neovascularização, associado a corpo estranho em segmento 2.

$$2: TA \times IA = 3 \times 3 + 3 / AG = 3$$

$$3: TA \times IA = 4 \times 5 + 2 / AG = 2$$

**Figura 20:** Rato 3 do grupo cirurgia, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago, o epíplon e a gordura epididimal. Aderência entre a parede abdominal e a gordura epididimal, tanto na cicatriz mediana como em toda extensão da hérnia incisional, associado as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



**Fonte:** Autoria própria.

## 4 Grupo Própolis Tópico

Foram utilizados sete animais no total pois o sexto animal operado foi à óbito no pós-operatório, sem causa definida, sendo substituído por um novo animal similar aos outros utilizados nesta pesquisa. Os seis animais avaliados no grupo própolis tópico (gastrotomia seguida de gastrorrafia + própolis intraperitoneal em dose única de 300 mg/kg/dia) evoluíram clinicamente bem até o 14º dia de pós-operatório, quando foi realizada a eutanásia. Durante a necropsia todos os animais apresentavam aderências exacerbadas, ultrapassando os limites do fígado, unindo firmemente o estômago, o fígado e o epíplon e, em alguns animais, a aderência acometia também o rim, associadas a presença de múltiplos depósitos amarelados em peritônio parietal e visceral tratando-se, provavelmente, de depósitos de própolis.

### 4.1 Grupo Própolis Tópico - Rato 01

O rato 01 (figura 21) deste grupo apresentava intensas aderências peritoneais acometendo a parede abdominal de quadrante superior esquerdo e aglomerado contendo o fígado, o estômago, o epíplon e o baço, associadas a outra aderência laminar entre o diafragma e o fígado. Presença ainda de aderências intensas entre o fígado, o estômago, o epíplon e o baço, além de focos de substância amarelada em várias áreas do peritônio parietal e visceral, sendo graduado com três pontos na escala de Evans<sup>(62)</sup> e quatro pontos na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 88 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Presença de extensa aderência entre a parede abdominal de quadrante superior esquerdo, no diafragma, e o aglomerado que englobava o fígado, o estômago, o epíplon e o baço, com fusão deste aglomerado à parede em mais da metade do quadrante 12', agravado com neovascularização, corpo estranho e mudança no aspecto da estrutura. Presença ainda de aderência laminar entre o diafragma e o fígado, em quadrante 11', com neovascularização, focos de corpo estranho e alteração no aspecto do fígado. Soma-se a isso alterações morfológicas nos quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: 1) alteração

no aspecto da estrutura, 2) neovascularização e 3) corpo estranho (focos de substâncias amareladas).

$$2': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

$$5': TA \times IA = 0 / AG = 2$$

$$8': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

$$9': TA \times IA = 0 / AG = 2$$

$$11': TA \times IA = 2 \times 2 + 3 / AG = 2$$

$$12': TA \times IA = 4 \times 4 + 3 / AG = 0$$

Abdome: Presença de aderências entre o fígado, o estômago e o epíplon, no quadrante 2, que ultrapassava a extensão do fígado, agravada com corpo estranho, neovascularização e alteração no aspecto da estrutura. Em quadrante 3, presença de aderências entre o fígado, o estômago, o epíplon e o baço, que ultrapassava a superfície do fígado, agravada com neovascularização, focos de substância amarelada e alteração no aspecto da estrutura, associadas a alterações morfológicas nestes quadrantes apresentando mudança no aspecto da estrutura (fígado de aspecto violáceo e edemaciado), neovascularização e corpo estranho (focos de substância amarelada, provavelmente própolis).

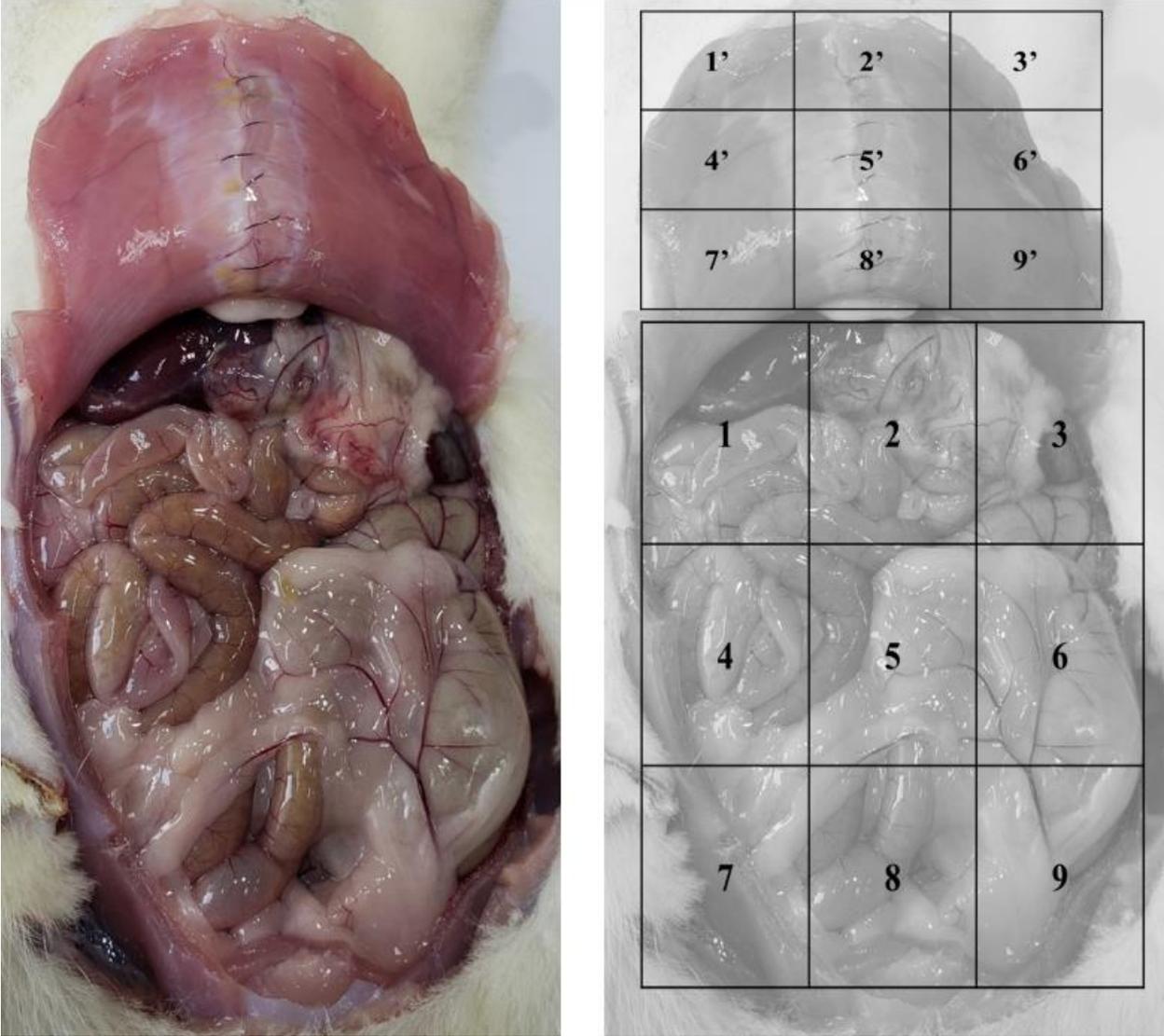
$$1: TA \times IA = 0 / AG = 2$$

$$2: TA \times IA = 3 \times 5 + 3 / AG = 3$$

$$3: TA \times IA = 4 \times 5 + 3 / AG = 3$$

$$5: TA \times IA = 0 / AG = 1$$

**Figura 21:** Rato 1 do grupo própolis tópico, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago, o epíplon e o baço. Aderência entre a parede abdominal e o aglomerado de estruturas acometendo o fígado, o estômago, o epíplon e o baço, em quadrante superior esquerdo, havia aderência entre o fígado e o diafragma (não visualizada nesta imagem). Focos de substância amarelada em áreas do peritônio parietal e visceral, associado as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



Fonte: Autoria própria.

#### 4.2 Grupo Própolis Tópico - Rato 02

O rato 02 (figura 22) deste grupo apresentava intensas aderências peritoneais acometendo a parede abdominal de quadrante superior esquerdo, no diafragma, e o aglomerado contendo o fígado, o estômago, o epíplon, o baço, uma alça de delgado e o rim. Além destas aderências encontrou-se aderência entre a gordura epididimal e dois pontos da parede abdominal (fora da área da cicatriz mediana). Presença ainda de aderências intensas entre o fígado, o estômago, o epíplon, uma alça de delgado, o rim e o baço, associadas a outra aderência entre o delgado, o epíplon e a gordura epididimal, com focos de substância amarelada em várias áreas do peritônio parietal e visceral, sendo graduado com três pontos na escala de Evans<sup>(62)</sup> e quatro pontos na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 104 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Presença de extensa aderência entre a parede abdominal (predominantemente diafragma) em quadrante superior esquerdo e o aglomerado que englobava o fígado, o estômago, o epíplon, o baço e uma alça de delgado, estendendo-se por mais da metade do quadrante, agravado com neovascularização, corpo estranho e mudança no aspecto da estrutura. Presença ainda de aderência laminar em dois pontos da parede abdominal, fora da área da cicatriz mediana, entre a gordura epididimal e a parede abdominal, agravada por focos de corpo estranho. Soma-se a isso alterações morfológicas nos quadrantes 2', 7' e 9' que apresentavam focos de corpo estranho (substância amarelada), 5' e 8', que apresentavam: 1) alteração no aspecto da estrutura, 2) neovascularização e 3) corpo estranho (fios de sutura e focos de substâncias amareladas).

$$2': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

$$5': TA \times IA = 0 / AG = 2$$

$$8': TA \times IA = 2 \times 2 + 3 / AG = 3$$

$$12': TA \times IA = 4 \times 4 + 3 / AG = 2$$

Abdome: Pequeno foco de aderência em quadrante 1, pontual, entre o epíplon e o fígado, agravado com neovascularização e alteração no aspecto do fígado. Presença de aderências entre o fígado, o estômago e o epíplon, no quadrante 2 que ultrapassava a extensão do fígado, agravada com corpo estranho, neovascularização e alteração no aspecto da estrutura. Em quadrante 3, presença de aderências entre o fígado, o estômago, o epíplon, o baço e uma alça de delgado, que ultrapassava a superfície do fígado, agravada com neovascularização, focos de substância amarelada e alteração no aspecto da estrutura (fígado violáceo e edemaciado), associadas a alterações morfológicas nestes quadrantes apresentando mudança no aspecto da estrutura (fígado de aspecto violáceo e edemaciado), neovascularização e corpo estranho (focos de substância amarelada, provavelmente própolis). No quadrante 5 presença de aderência laminar entre uma alça de delgado e o epíplon à gordura epididimal, associado a foco de corpo estranho e neovascularização. No quadrante 6 presença de aderência laminar entre o fígado e o rim esquerdo, agravado com neovascularização e focos de substância amarelada, além de focos de substância amarelada em outras áreas deste quadrante.

$$1: TA \times IA = 2 \times 1 + 2 / AG = 2$$

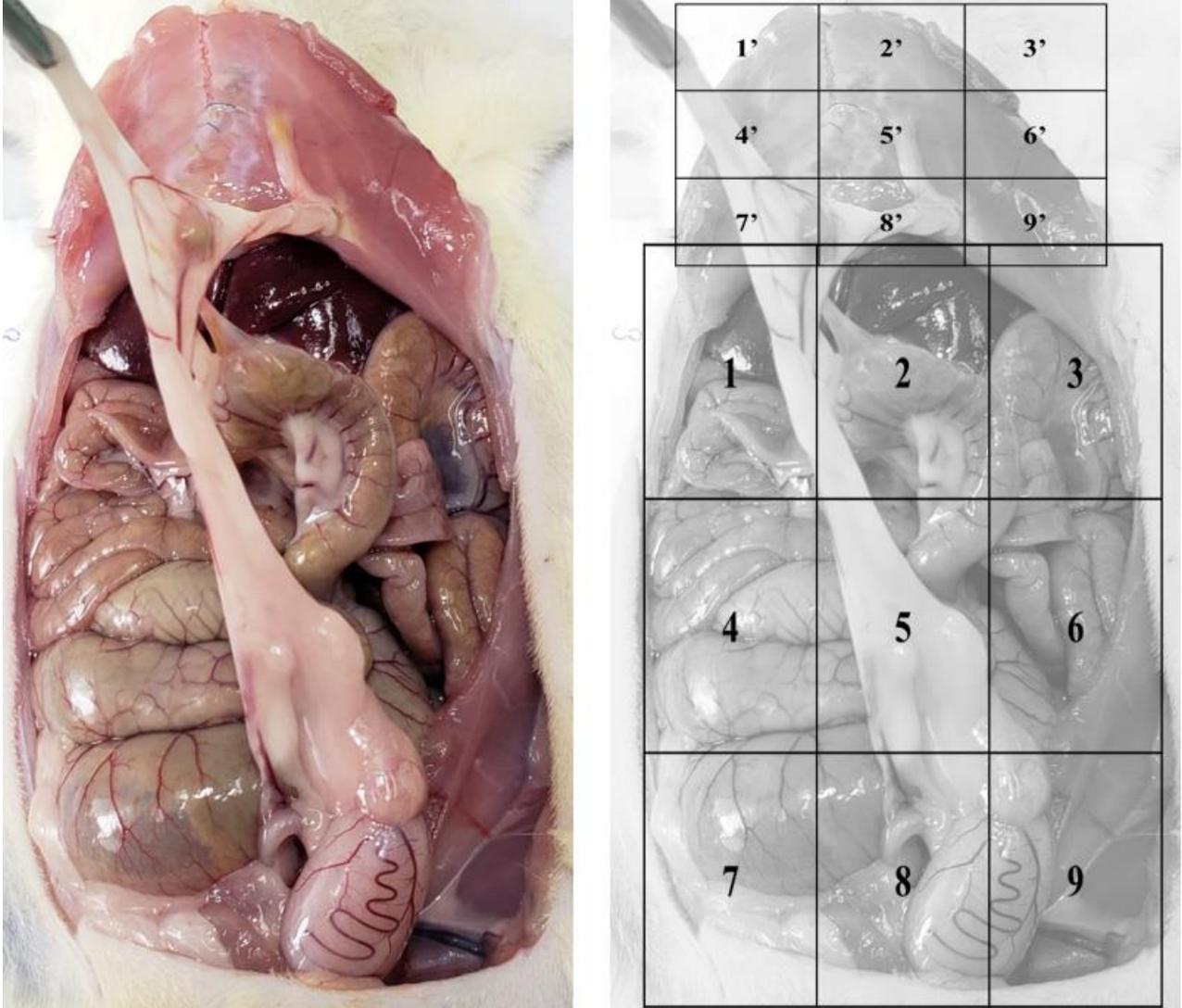
$$2: TA \times IA = 3 \times 4 + 3 / AG = 3$$

$$3: TA \times IA = 4 \times 5 + 3 / AG = 3$$

$$5: TA \times IA = 3 \times 2 + 2 / AG = 1$$

$$6: TA \times IA = 2 \times 2 + 2 / AG = 1$$

**Figura 22:** Rato 2 do grupo própolis tópico, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago, o epíplon, uma alça de delgado e o baço, com esse aglomerado aderindo à parede abdominal em quadrante superior esquerdo. Aderência entre a parede abdominal e a gordura epididimal e da gordura epididimal ao epíplon e alça de delgado, associado a focos de substância amarelada em áreas do peritônio parietal e visceral, associado as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



Fonte: Autoria própria.

### 4.3 Grupo Própolis Tópico - Rato 03

O rato 03 (figura 23) deste grupo não apresentava aderências acometendo a parede abdominal. Presença de aglomerado contendo o fígado, o estômago, o epíplon, o baço e o rim. Além destas aderências encontrou-se aderência entre o duodeno e o fígado e entre uma alça de delgado e o fígado. Focos de substância amarelada em várias áreas do peritônio parietal e visceral, sendo graduado com três pontos na escala tanto de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 84 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Ausência de aderências acometendo a parede abdominal, os quadrantes 2', 5' e 8' apresentavam: 1) alteração no aspecto da estrutura, 2) neovascularização e 3) corpo estranho (fios de sutura e focos de substâncias amareladas).

2': TA x IA = 0 / AG = 3

5': TA x IA = 0 / AG = 3

8': TA x IA = 0 / AG = 3

Abdome: Foco de aderência em quadrante 1, pontual, entre o fígado e uma alça de delgado, agravada pela alteração no aspecto do fígado. Presença de aderências entre o fígado, o estômago, o epíplon e o duodeno, no quadrante 2 que ultrapassava metade da extensão do fígado, agravada com corpo estranho, neovascularização e alteração no aspecto da estrutura. Em quadrante 3, presença de aderências entre o fígado, o estômago, o epíplon e o baço, que ultrapassava a superfície do fígado, agravada com neovascularização, focos de substância amarelada e alteração no aspecto da estrutura (fígado violáceo e edemaciado), associadas a alterações morfológicas nestes quadrantes apresentando mudança no aspecto da estrutura (fígado de aspecto violáceo e edemaciado), neovascularização (ausente no quadrante 1) e corpo estranho (focos de substância amarelada, provavelmente própolis). No quadrante 5 e 8 presença de foco de corpo estranho. No quadrante 6 presença de aderência entre o fígado, o

epíplon, o baço e o rim esquerdo, agravado com neovascularização e mudança no aspecto da estrutura, além de neovascularização e mudança no aspecto da estrutura (fígado de aspecto violáceo e edemaciado) em outras áreas deste quadrante.

$$1: TA \times IA = 2 \times 1 + 1 / AG = 2$$

$$2: TA \times IA = 4 \times 4 + 3 / AG = 3$$

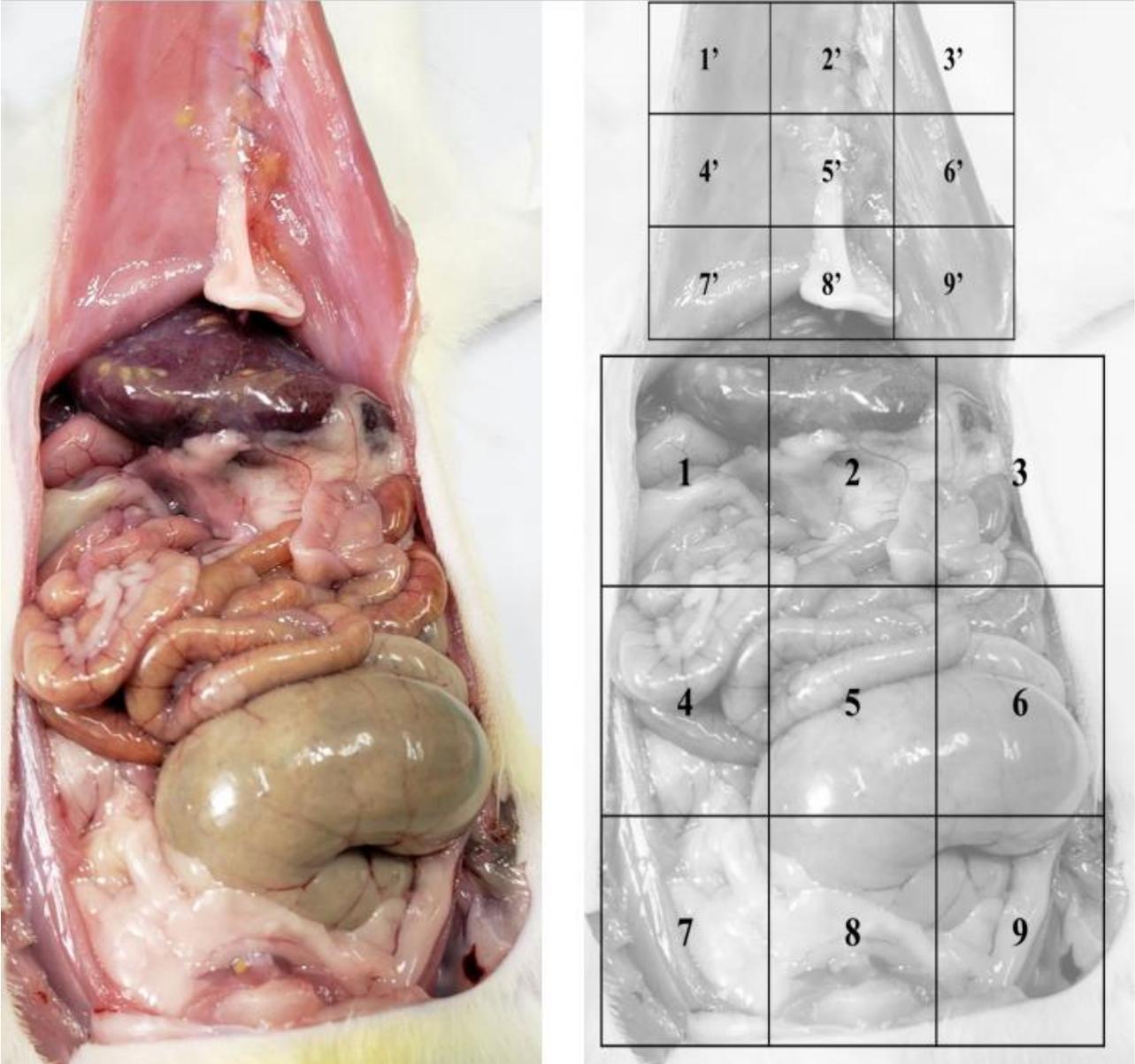
$$3: TA \times IA = 4 \times 5 + 3 / AG = 3$$

$$5: TA \times IA = 0 / AG = 1$$

$$6: TA \times IA = 4 \times 4 + 2 / AG = 2$$

$$8: TA \times IA = 0 / AG = 1$$

**Figura 23:** Rato 3 do grupo própolis tópico, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago, o duodeno, o epíplon e o baço. Ausência de aderência acometendo a parede abdominal. Focos de substância amarelada em áreas do peritônio parietal e visceral, associado as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



**Fonte:** Autoria própria.

#### 4.4 Grupo Própolis Tópico - Rato 04

O rato 04 (figura 24) deste grupo não apresentava aderências acometendo a parede abdominal, presença de aglomerado contendo o fígado, o estômago, o epíplon, o baço e a fásia de Gerota. Além destas aderências encontrou-se aderência entre as gorduras epididimais. Focos de substância amarelada em várias áreas do peritônio parietal e visceral, sendo graduado com três pontos na escala tanto de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 79 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Ausência de aderências acometendo a parede abdominal, os quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: 1) alteração no aspecto da estrutura, 2) neovascularização e 3) corpo estranho (fios de sutura e focos de substâncias amareladas). Nos quadrantes 10' e 12', foram encontrados focos de substância amarelada e no quadrante 11' focos de neovascularização.

2': TA x IA = 0 / AG = 3

5': TA x IA = 0 / AG = 3

8': TA x IA = 0 / AG = 3

10': TA x IA = 0 / AG = 1

11': TA x IA = 0 / AG = 1

12': TA x IA = 0 / AG = 1

Abdome: Em quadrante 2 presença de aderências entre o fígado, o estômago e o epíplon que ultrapassava metade de extensão do fígado, agravada com corpo estranho, neovascularização e alteração no aspecto da estrutura, em quadrante 3, presença de aderências entre o fígado, o estômago, o epíplon e o baço, que ultrapassava a superfície do fígado, agravada com neovascularização, focos de substância amarelada e alteração no aspecto da estrutura (fígado violáceo e edemaciado). Presença de alterações morfológicas em quadrantes 1, 2 e 3 apresentando mudança no aspecto da estrutura (fígado de aspecto violáceo e edemaciado), neovascularização (ausente no quadrante 1) e corpo estranho

(focos de substância amarelada, provavelmente própolis). No quadrante 5, presença de aderências entre as gorduras epididimais, agravada com alteração no aspecto (provável granuloma), foco de corpo estranho (focos de substância amarelada) e neovascularização, associadas a focos amarelados fora da área de aderência. No quadrante 6 presença de aderência entre o estômago, o epíplon, o baço e a fásia de Gerota, sendo esta de forma laminar, agravado com neovascularização e focos de substância amarelada, além de neovascularização e focos de substância amarelada em outras áreas deste quadrante.

$$1: TA \times IA = 0 / AG = 2$$

$$2: TA \times IA = 3 \times 4 + 3 / AG = 3$$

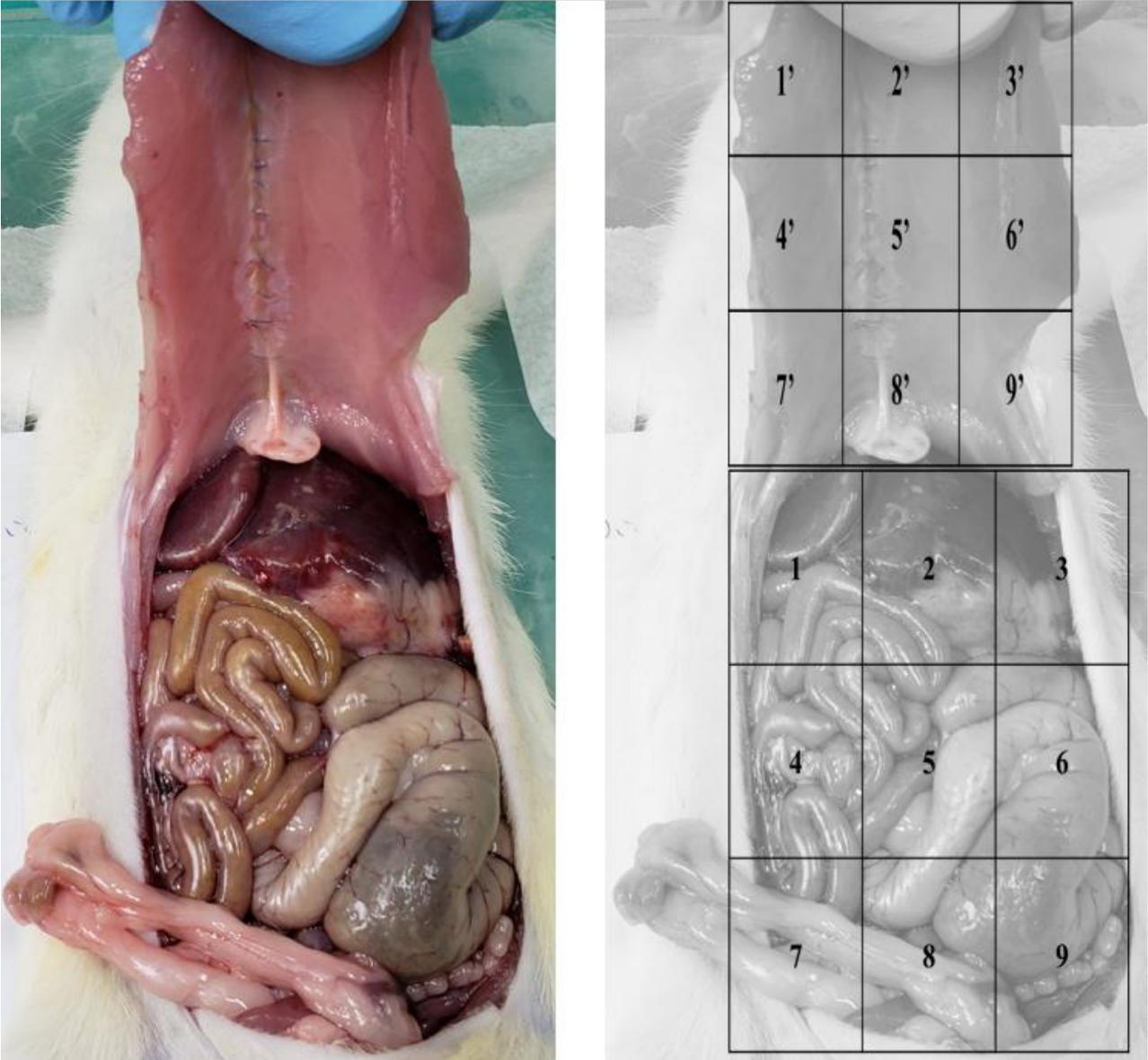
$$3: TA \times IA = 4 \times 5 + 3 / AG = 3$$

$$5: TA \times IA = 2 \times 2 + 3 / AG = 1$$

$$6: TA \times IA = 4 \times 2 + 2 / AG = 2$$

$$8: TA \times IA = 0 / AG = 1$$

**Figura 24:** Rato 4 do grupo própolis tópico, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago, o epíplon, o baço e a fáscia de Gerota, associado a aderências entre as gorduras epididimais. Ausência de aderência acometendo a parede abdominal. Focos de substância amarelada em áreas do peritônio parietal e visceral, associado as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



Fonte: Autoria própria.

#### 4.5 Grupo Própolis Tópico - Rato 05

O rato 05 (figura 25) deste grupo apresentava dois focos de aderência acometendo a parede abdominal, o primeiro ligava, no quadrante 11', o apêndice xifóide e o diafragma ao fígado e o epíplon, o segundo foco acometendo a parede e o diafragma em quadrante superior esquerdo em aglomerado contendo o fígado, o estômago, o epíplon, o baço e a fásia de Gerota à esquerda. Foram encontrados também focos de substância amarelada em várias áreas do peritônio parietal e visceral, sendo graduado com três pontos na escala de Evans<sup>(62)</sup> e quatro pontos na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 139 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Presença de dois focos de aderência, o primeiro em quadrante 11', acometendo o apêndice xifóide e o diafragma ao fígado e o epíplon que tinha como agravante a alteração no aspecto da estrutura, neovascularização e corpo estranho (focos de substâncias amareladas) e o segundo foco acometendo a parede e o diafragma em quadrante 12' ligando ao aglomerado contendo o fígado, o estômago, o epíplon, o baço e a fásia de Gerota, agravado com alteração no aspecto da estrutura, neovascularização e corpo estranho (focos de substâncias amareladas). Os quadrantes 2', 5' e 8' apresentavam: 1) alteração no aspecto da estrutura, 2) neovascularização e 3) corpo estranho (fios de sutura e focos de substâncias amareladas). Nos quadrantes 7', 10' e 12', foram encontrados focos de substância amarelada e, em quadrante 11', alteração no aspecto da estrutura, neovascularização e corpo estranho (focos de substâncias amareladas)

1': TA x IA = 0 / AG = 1

2': TA x IA = 0 / AG = 3

3': TA x IA = 0 / AG = 1

4': TA x IA = 0 / AG = 2

5': TA x IA = 0 / AG = 3

6': TA x IA = 0 / AG = 1

7': TA x IA = 0 / AG = 1

8': TA x IA = 0 / AG = 3

$$10': TA \times IA = 0 / AG = 1$$

$$11': TA \times IA = 4 \times 4 + 3 / AG = 3$$

$$12': TA \times IA = 4 \times 4 + 3 / AG = 1$$

Abdome: Em quadrante 1 presença de aderências entre o fígado, o epíplon e o duodeno, agravado com alteração no aspecto da estrutura, neovascularização e corpo estranho (focos de substâncias amareladas), além destas mesmas alterações no quadrante fora da área de aderência. Em quadrante 2 presença de aderência entre o fígado, o estômago e o epíplon que se juntava ao acometimento da parede abdominal de segmento 11' e que ultrapassava a extensão do fígado, agravada com corpo estranho, neovascularização e alteração no aspecto da estrutura, associadas as alterações no quadrante agravado com corpo estranho, neovascularização e alteração no aspecto da estrutura, fora da área de aderência. Em quadrante 3, presença de aderências entre o fígado, o estômago, o epíplon e o baço, que ultrapassava a superfície do fígado e acometia a parede abdominal em quadrante 12', agravada com neovascularização, focos de substância amarelada e alteração no aspecto da estrutura (fígado violáceo e edemaciado), além destas mesmas alterações no quadrante fora da área de aderência. No quadrante 6, presença de aderências entre o estômago, o epíplon, o baço e a gordura de Gerota, agravada com neovascularização, associadas a neovascularização em outras áreas deste quadrante.

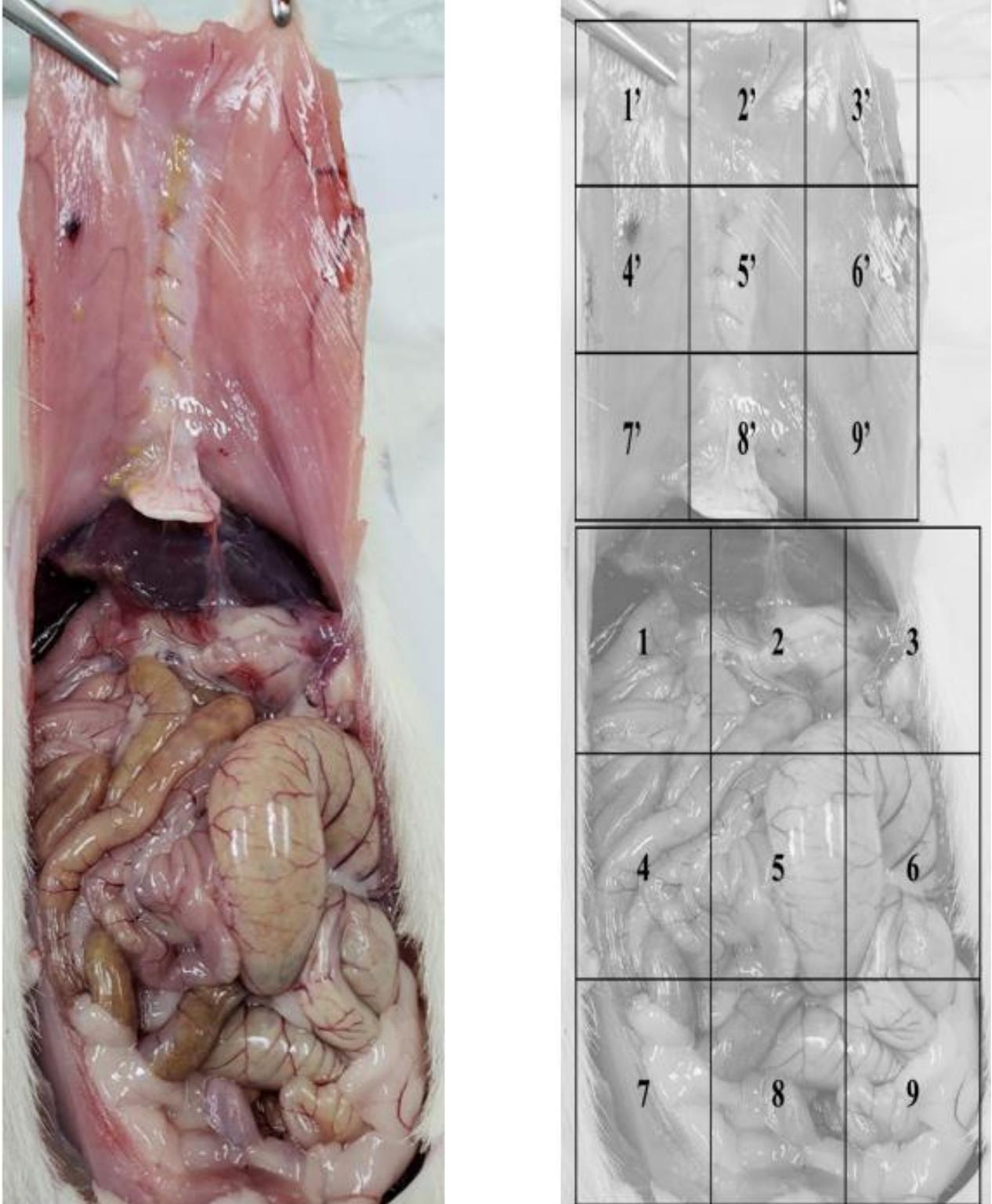
$$1: TA \times IA = 3 \times 3 + 3 / AG = 3$$

$$2: TA \times IA = 4 \times 5 + 3 / AG = 3$$

$$3: TA \times IA = 4 \times 5 + 3 / AG = 3$$

$$6: TA \times IA = 4 \times 3 + 1 / AG = 1$$

**Figura 25:** Rato 5 do grupo própolis tópico, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago, o epíplon, o baço e a fáscia de Gerota. Ausência de aderência acometendo a parede abdominal. Focos de substância amarelada em áreas do peritônio parietal e visceral, associado as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



**Fonte:** Autoria própria.

#### 4.6 Grupo Própolis Tópico - Rato 06

O rato 06 (figura 26) deste grupo não apresentava aderências acometendo a parede abdominal, presença de aderência acometendo o fígado, o estômago e o epíplon. Focos de substância amarelada em várias áreas do peritônio parietal e visceral, sendo graduado com três pontos na escala tanto de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 48 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Ausência de aderências acometendo a parede abdominal, os quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: 1) alteração no aspecto da estrutura, 2) neovascularização e 3) corpo estranho (fios de sutura e focos de substâncias amareladas). Nos quadrantes 6' e 12', foram encontrados focos de substância amarelada.

2': TA x IA = 0 / AG = 3

5': TA x IA = 0 / AG = 3

6': TA x IA = 0 / AG = 1

8': TA x IA = 0 / AG = 3

12': TA x IA = 0 / AG = 1

Abdome: Em quadrante 1 presença de alteração no aspecto do fígado e focos de depósito de substância amarelada, no quadrante 2 presença de aderências entre o fígado, o estômago e o epíplon que acometia menos da metade de extensão do fígado, agravada com alteração no aspecto da estrutura, em quadrante 3, presença de aderências entre o fígado, o estômago e o epíplon que ultrapassava a superfície do fígado, agravada com neovascularização, focos de substância amarelada e alteração no aspecto da estrutura (fígado violáceo e edemaciado). Presença de alterações morfológicas em quadrantes 1, 2 e 3 apresentando mudança no aspecto da estrutura (fígado de aspecto violáceo e edemaciado), neovascularização (ausente no quadrante 1) e corpo estranho (focos de substância amarelada, provavelmente própolis). No quadrante 4

presença de hematoma em parede de alça intestinal que pode, ou não, estar associada ao procedimento de anestesia geral por punção de cavidade peritoneal.

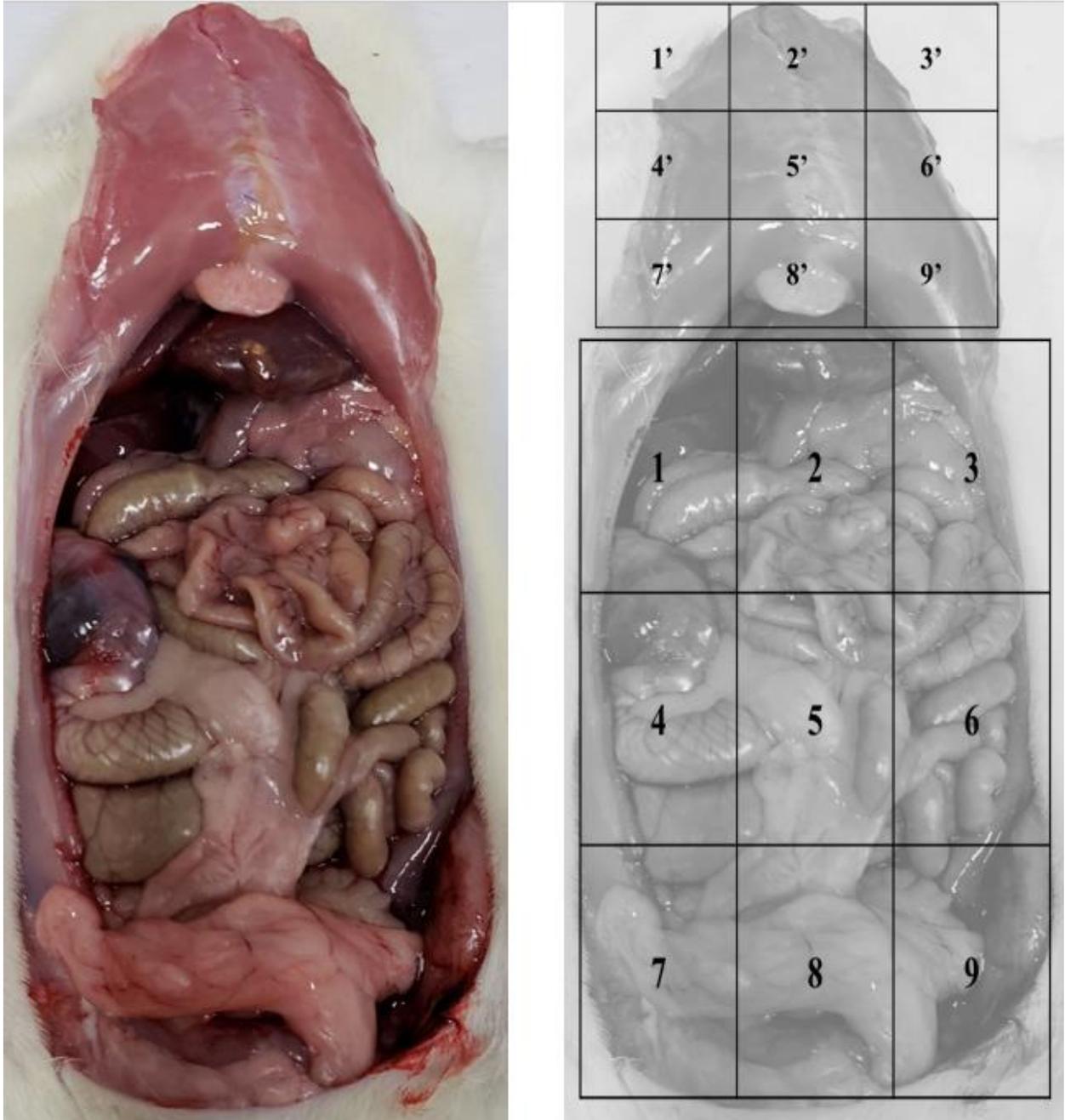
$$1: TA \times IA = 0 / AG = 2$$

$$2: TA \times IA = 3 \times 3 + 1 / AG = 3$$

$$3: TA \times IA = 3 \times 5 + 3 / AG = 3$$

$$4: TA \times IA = 0 / AG = 1$$

**Figura 26:** Rato 6 do grupo própolis tópico, sem aderências acometendo a parede abdominal, apresentando aderência peritoneal acometendo o fígado, o estômago e o epíplon. Focos de substância amarelada em áreas do peritônio parietal e visceral, associado as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



Fonte: Autoria própria.

## 5 Grupo Própolis 100 mg/kg/dia

Os seis animais do grupo própolis 100 mg/kg/dia (gastrotomia seguida de gastrorrafia + dose diária de própolis 100 mg/kg) evoluíram clinicamente bem até o 14º dia de pós-operatório, quando foi realizada a eutanásia. A quantidade e extensão das aderências foram variadas e pormenorizadas a seguir.

### 5.1 Grupo Própolis 100 mg/kg/dia - Rato 01

O rato 01 (figura 27) deste grupo apresentava mínimas aderências peritoneais entre o fígado e o estômago, de aspecto laminar, sendo graduado com dois pontos na escala de Evans<sup>(62)</sup> e um ponto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 23 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Presença de alterações morfológicas nos quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: alteração no aspecto da estrutura, neovascularização (exceto quadrante 2') e corpo estranho (fio de sutura).

$$2': TA \times IA = 0 / AG = 2$$

$$5': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

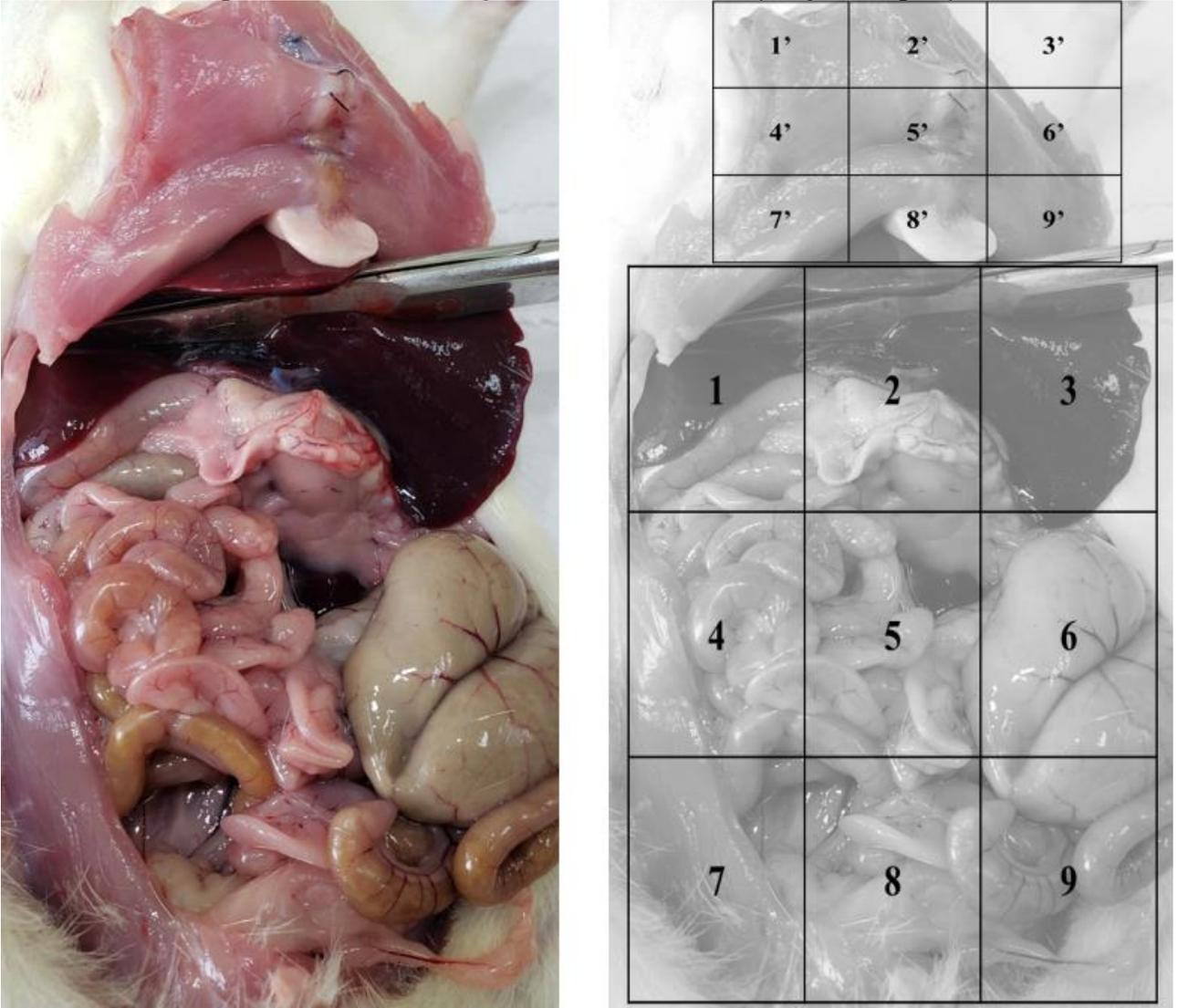
$$8': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

Abdome: Presença de aderência laminar entre o fígado e o estômago, onde no quadrante 2 foi agravado com neovascularização e alteração no aspecto da estrutura e corpo estranho (fios de sutura), enquanto no quadrante 3 essa aderência descrita acima apresentava-se agravada com alteração no aspecto da estrutura, associadas a alterações morfológicas nestes quadrantes apresentando mudança no aspecto da estrutura (fígado de aspecto violáceo e edemaciado) e corpo estranho (fio de sutura em quadrante 2).

$$2: TA \times IA = 2 \times 2 + 3 / AG = 2$$

$$3: TA \times IA = 2 \times 2 + 1 / AG = 1$$

**Figura 27:** Rato 1 do grupo própolis 100 mg/kg/dia, com mínimas aderências peritoneais entre o fígado e o estômago, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



Fonte: Autoria própria.

## 5.2 Grupo Própolis 100 mg/kg/dia - Rato 02

O rato 02 (figura 28) deste grupo apresentava aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 31 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Presença de alterações morfológicas nos quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: alteração no aspecto da estrutura e corpo estranho (fio de sutura).

$$2': TA \times IA = 0 / AG = 2$$

$$5': TA \times IA = 0 / AG = 2$$

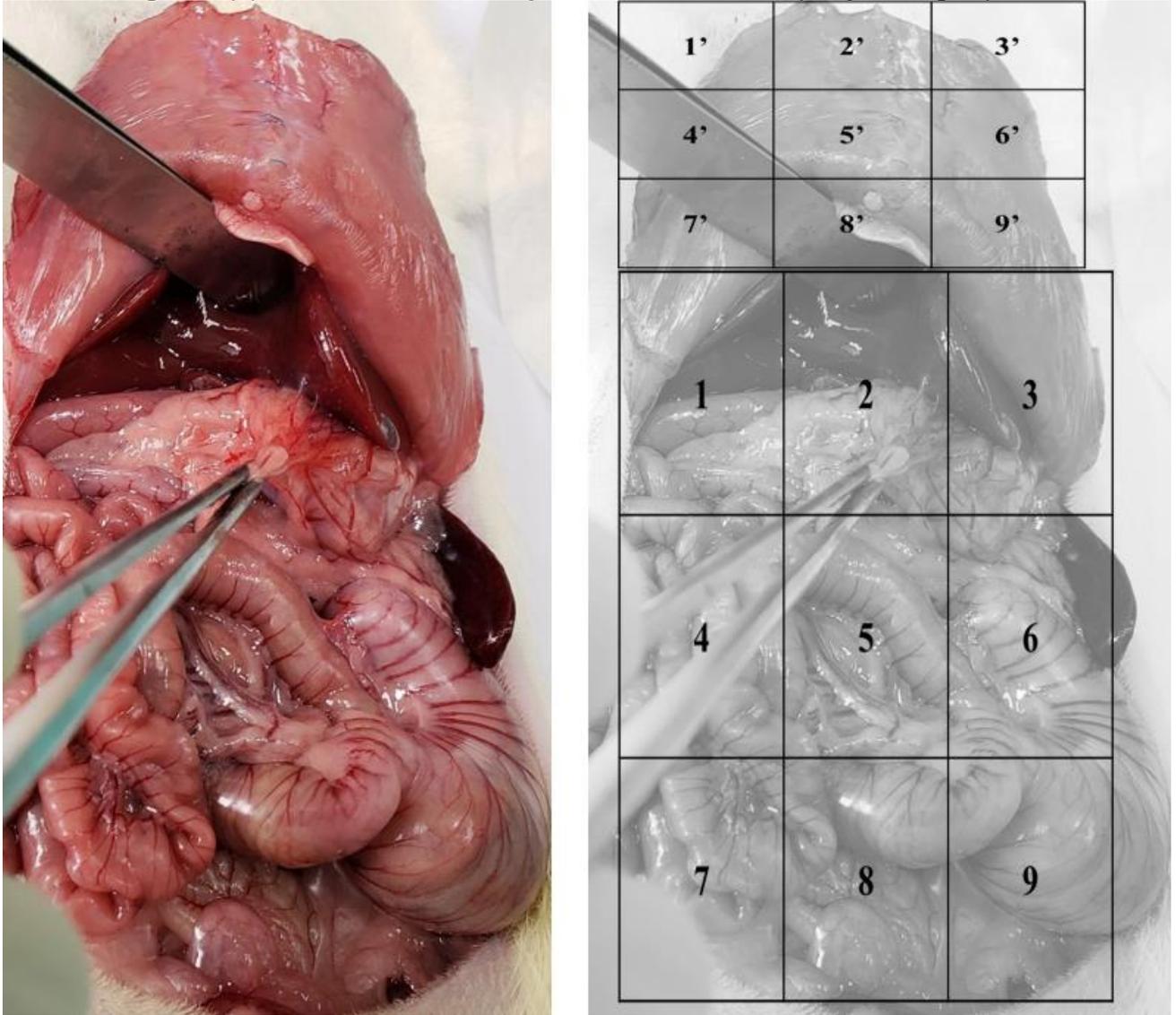
$$8': TA \times IA = 0 / AG = 2$$

Abdome: Presença de aderência entre o fígado, o estômago e o epíplon, onde no quadrante 2 ocupava menos da metade da superfície do fígado e no quadrante 3 essa aderência acima descrita apresentava-se ocupando mais da metade da superfície do fígado, em ambos os quadrantes agravada com neovascularização, além de que nesses quadrantes, fora das áreas de aderência, apresentavam focos de neovascularização.

$$2: TA \times IA = 3 \times 3 + 1 / AG = 1$$

$$3: TA \times IA = 3 \times 4 + 1 / AG = 1$$

**Figura 28:** Rato 2 do grupo própolis 100 mg/kg/dia, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



Fonte: Autoria própria.

### 5.3 Grupo Própolis 100 mg/kg/dia - Rato 03

O rato 03 (figura 29) deste grupo apresentava aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 31 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Presença de alterações morfológicas nos quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: alteração no aspecto da estrutura, neovascularização e corpo estranho (fio de sutura).

$$2': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

$$5': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

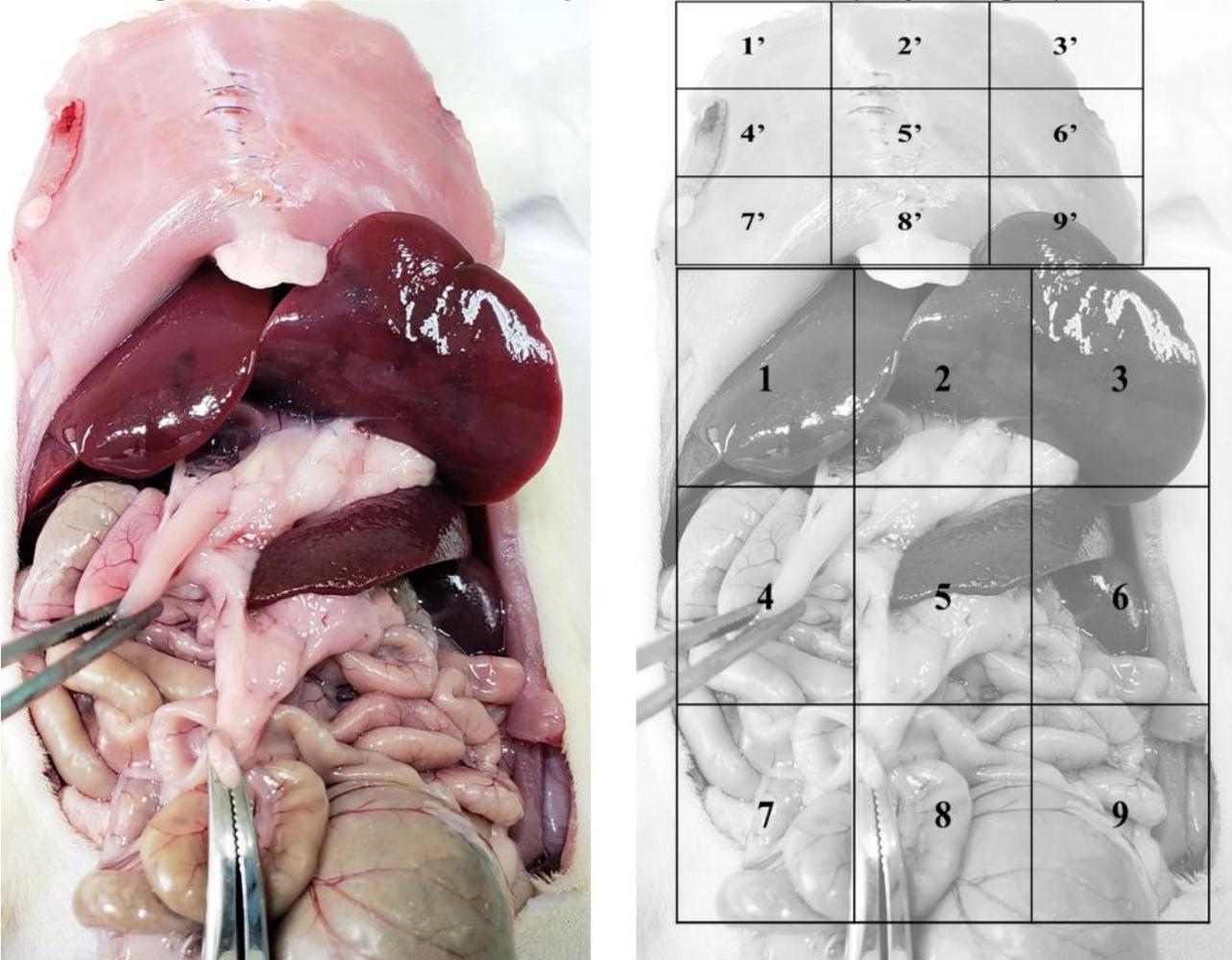
$$8': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

Abdome: Presença de aderência entre o fígado, o estômago e o epíplon, onde no quadrante 2 apresentava forma laminar e era agravada com alteração no aspecto da estrutura e neovascularização. No quadrante 3 essa aderência acima descrita apresentava-se ocupando mais da metade da superfície do fígado e era agravada com neovascularização, alteração no aspecto da estrutura e corpo estranho (fio de sutura). No quadrante 2, fora das áreas de aderência, apresentavam focos de neovascularização.

$$2: TA \times IA = 3 \times 2 + 2 / AG = 1$$

$$3: TA \times IA = 3 \times 4 + 1 / AG = 0$$

**Figura 29:** Rato 3 do grupo própolis 100 mg/kg/dia, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



**Fonte:** Autoria própria.

#### 5.4 Grupo Própolis 100 mg/kg/dia - Rato 04

O rato 04 (figura 30) deste grupo apresentava aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, este animal pontuava com 29 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Presença de alterações morfológicas nos quadrantes 5' e 8', que apresentavam: alteração no aspecto da estrutura, neovascularização e corpo estranho (fio de sutura). E no quadrante 2 com alteração no aspecto da estrutura e neovascularização.

$$2': TA \times IA = 0 / AG = 2$$

$$5': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

$$8': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

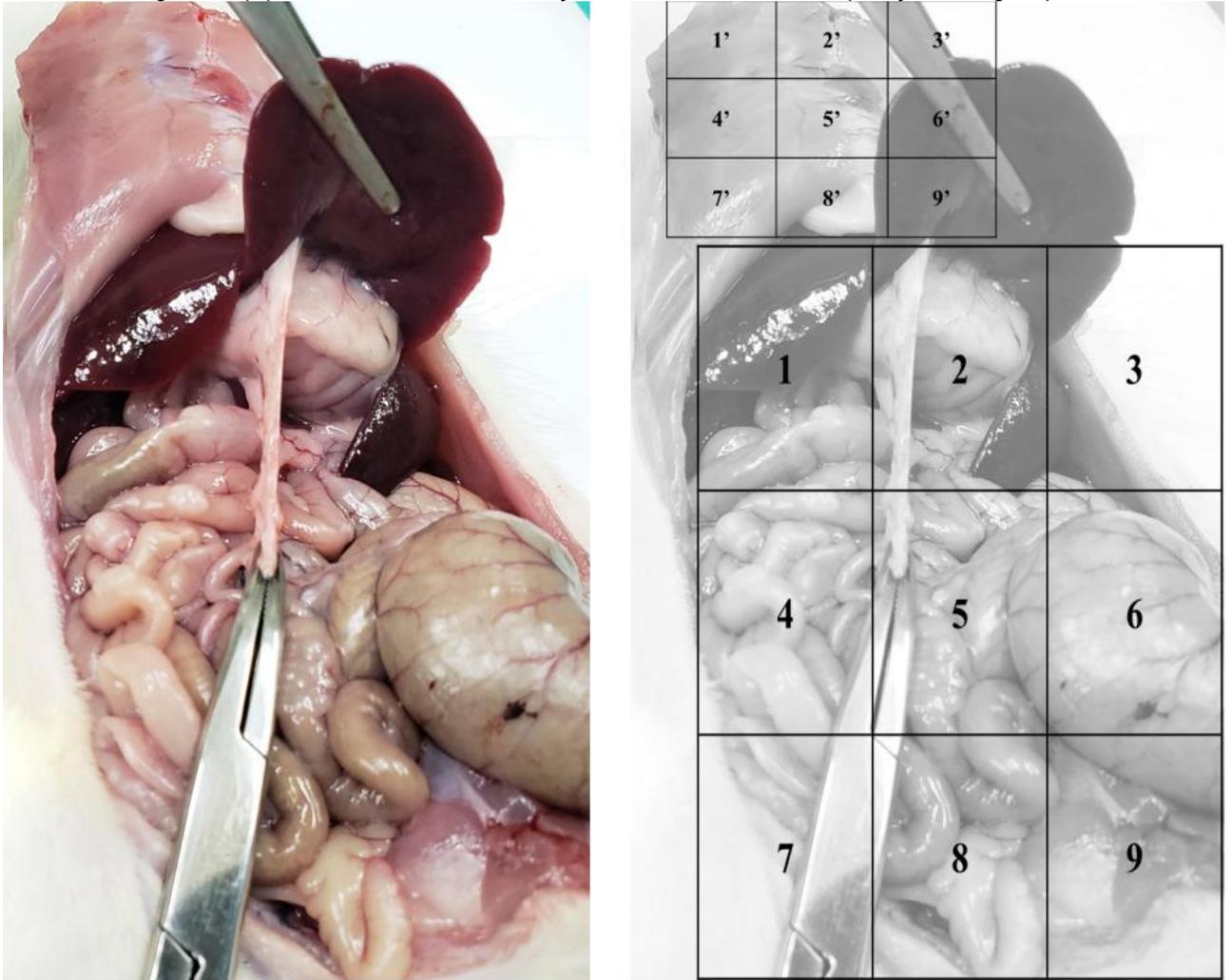
Abdome: Presença de aderência entre o fígado, o estômago e o epíplon, em quadrantes 2 e 3, ocupando menos da metade da superfície do fígado e agravada com neovascularização. No quadrante 5 haviam focos de neovascularização.

$$2: TA \times IA = 3 \times 3 + 1 / AG = 0$$

$$3: TA \times IA = 3 \times 3 + 1 / AG = 0$$

$$5: TA \times IA = 0 / AG = 1$$

**Figura 30:** Rato 4 do grupo própolis 100 mg/kg/dia, com aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



Fonte: Autoria própria.

### 5.5 Grupo Própolis 100 mg/kg/dia - Rato 05

O rato 05 (figura 31) deste grupo apresentava aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, associadas a aderência laminar entre o diafragma esquerdo e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, esse animal pontuava com 33 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Presença de alterações morfológicas nos quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: alteração no aspecto da estrutura e corpo estranho (fio de sutura). No quadrante 12' presença de aderência laminar entre o epíplon e o diafragma, sem agravantes.

$$2': TA \times IA = 0 / AG = 2$$

$$5': TA \times IA = 0 / AG = 2$$

$$8': TA \times IA = 0 / AG = 2$$

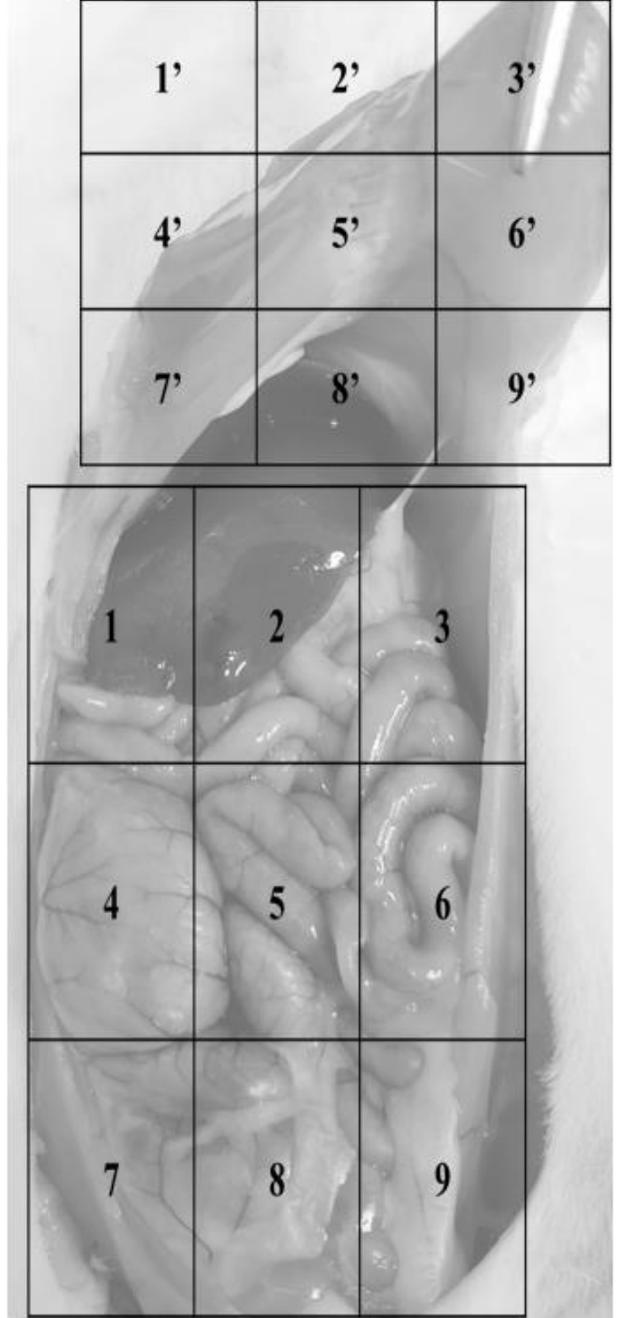
$$12': TA \times IA = 2 \times 2 / AG = 0$$

Abdome: Presença de aderência entre o fígado, o estômago e o epíplon, em quadrantes 2 e 3. No quadrante 2 ocupava menos da metade da superfície do fígado, sem agravantes e no quadrante 3 ocupava mais da metade do fígado, é agravada por neovascularização e fora da área de aderência neste quadrante pode-se notar fio de sutura (corpo estranho).

$$2: TA \times IA = 3 \times 3 / AG = 0$$

$$3: TA \times IA = 3 \times 4 + 1 / AG = 1$$

**Figura 31:** Rato 5 do grupo própolis 100 mg/kg/dia, presença de aderência laminar entre o epíplon e o diafragma em quadrante 12', associado a aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, além das alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



Fonte: Autoria própria.

### 5.6 Grupo Própolis 100 mg/kg/dia - Rato 06

O rato 06 (figura 32) deste grupo apresentava aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, esse animal pontuava com 33 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Presença de alterações morfológicas nos quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: alteração no aspecto da estrutura, neovascularização (exceto quadrante 8) e corpo estranho (fio de sutura).

$$2': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

$$5': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

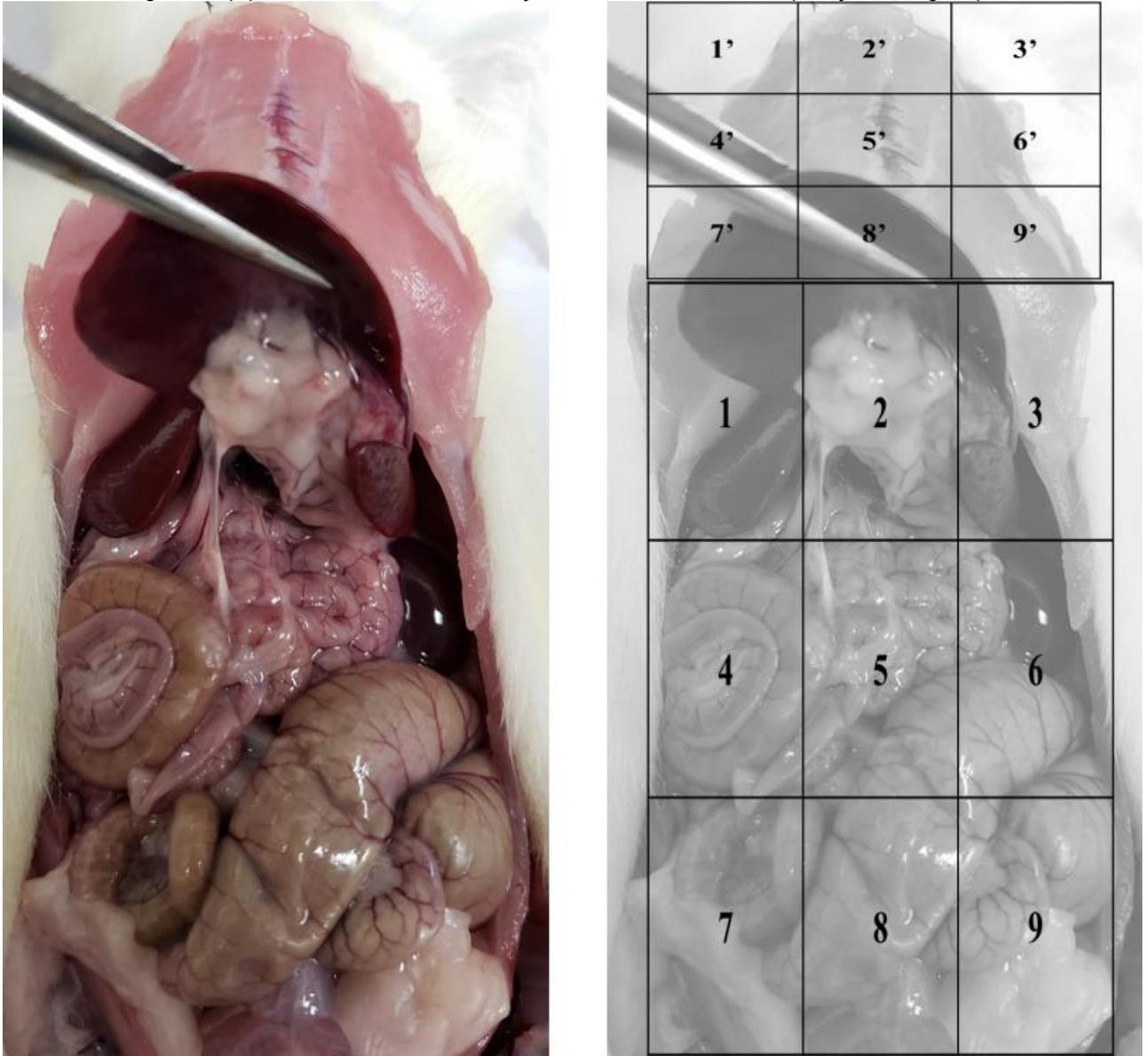
$$8': TA \times IA = 0 / AG = 2$$

Abdome: Presença de aderência entre o fígado, o estômago e o epíplon, em quadrantes 2 e 3. No quadrante 2 ocupava menos da metade da superfície do fígado, agravada com neovascularização e no quadrante 3 ocupava mais da metade do fígado, agravada por neovascularização. Fora da área de aderência no quadrante 2 pode-se notar fio de sutura (corpo estranho) e no quadrante 3 neovascularização

$$2: TA \times IA = 3 \times 3 + 1 / AG = 1$$

$$3: TA \times IA = 3 \times 4 + 1 / AG = 1$$

**Figura 32:** Rato 6 do grupo própolis 100 mg/kg/dia, presença de aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



**Fonte:** Autoria própria.

## 6 Grupo Própolis 300 mg/kg/dia

Foram utilizados oito animais no total, já que o primeiro e o quinto animais foram excluídos e substituídos por dois novos animais, similares a todos os outros utilizados nesta pesquisa. O primeiro animal operado apresentou parada cardiorrespiratória no oitavo dia de pós-operatório, provavelmente por broncoaspiração, durante a administração da solução de própolis por gavagem. Foram realizadas manobras de ressuscitação, com compressão externa da caixa torácica e o animal foi mantido vivo sendo realizada a eutanásia no 14º dia de pós-operatório, sem nova administração de própolis. À eutanásia, notava-se a presença de moderadas aderências entre o fígado, o estômago e o epíplon. O quinto animal foi encontrado morto no sexto dia de pós-operatório, à necropsia apresentava aderência leve entre o fígado e o estômago somente em área da sutura gástrica. A *causa mortis* não foi definida.

Os seis animais analisados no grupo própolis 300 mg/kg/dia (gastrotomia seguida de gastrorrafia + dose diária de própolis 300 mg/kg) evoluíram clinicamente bem até o 14º dia de pós-operatório, quando foi realizada a eutanásia. A quantidade e extensão das aderências foram variadas e pormenorizadas a seguir.

### 6.1 Grupo Própolis 300 mg/kg/dia - Rato 01

O rato 01 (figura 33) deste grupo apresentava aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, além de três focos de aderência à parede abdominal, a saber: gordura epididimal à cicatriz mediana, fígado ao diafragma e o aglomerado contendo o fígado, o estômago, o epíplon e o baço, aderindo ao diafragma e à parede abdominal de hipocôndrio esquerdo, sendo graduado com três pontos na escala de Evans<sup>(62)</sup> e quatro pontos na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, esse animal pontuava com 78 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Aderência de gordura epididimal à parede abdominal em quadrante 8', laminar e agravado com alteração no aspecto da estrutura, neovascularização e corpo estranho (fio de sutura). Em quadrante 11' presença de aderência laminar agravada com neovascularização entre o fígado e o diafragma, iniciando na base

do apêndice xifóide, Em quadrante 12' presença de aderência que acometia mais da metade do quadrante, englobando a parede abdominal, o fígado, o estômago, o epíplon e o baço, agravada com neovascularização e alteração no aspecto da estrutura. Presença de alterações morfológicas nos quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: alteração no aspecto da estrutura, neovascularização e corpo estranho (fio de sutura).

$$2': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

$$5': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

$$8': TA \times IA = 2 \times 2 + 3 / AG = 3$$

$$11': TA \times IA = 2 \times 2 + 1 / AG = 0$$

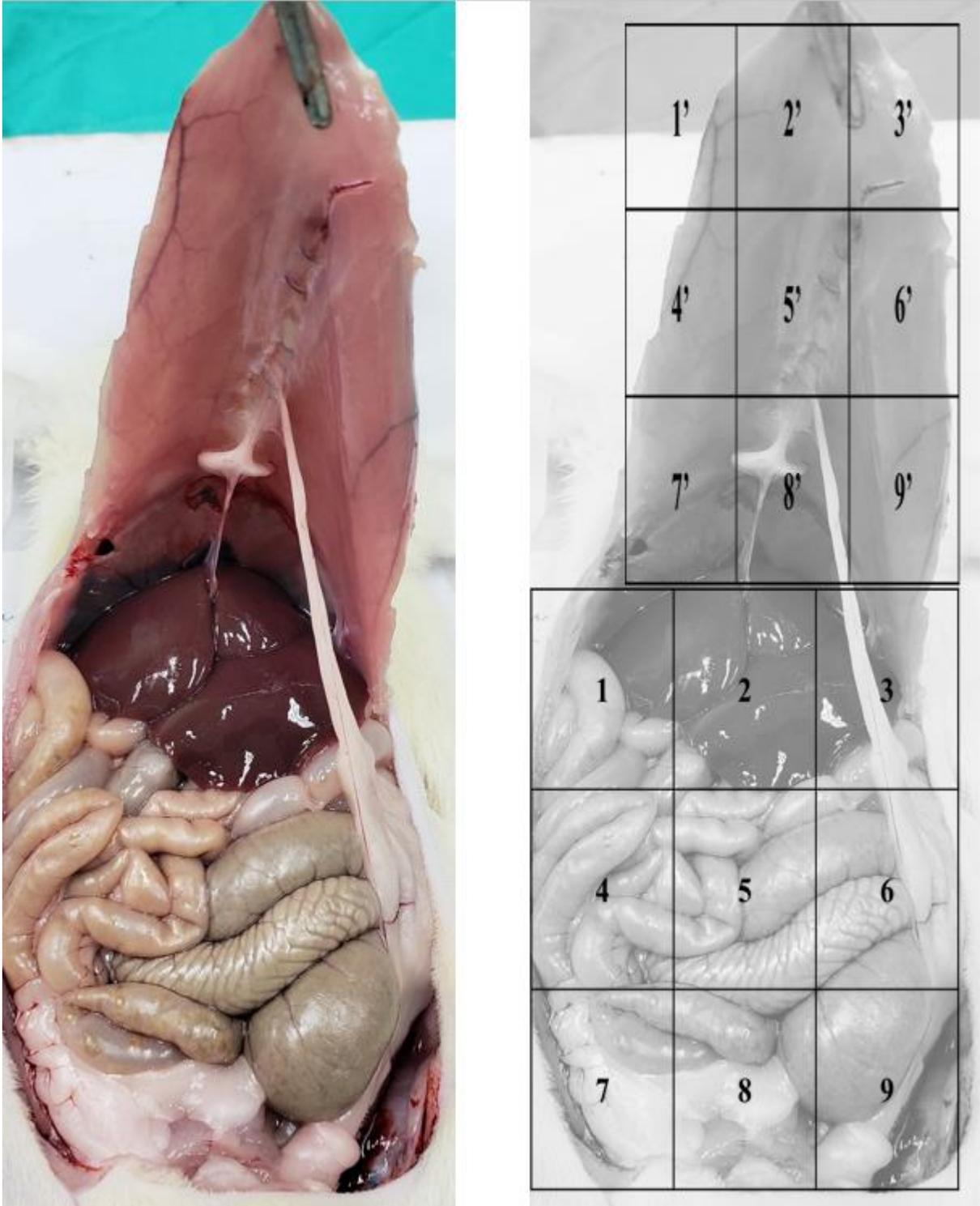
$$12': TA \times IA = 4 \times 4 + 2 / AG = 2$$

Abdome: Presença de aderência entre o fígado, o epíplon e o estômago, no quadrante 2, agravado com neovascularização, que ocupava mais da metade da superfície do estômago, apresentando o epíplon aglutinado sobre parede anterior do estômago e aderindo também ao fígado. No quadrante 3 essa aderência acima descrita acometia o fígado, o estômago, o epíplon, o baço e a parede abdominal de hipocôndrio esquerdo e o diafragma, agravada com a alteração no aspecto da estrutura (em diafragma) e neovascularização. Além das aderências no quadrante 3 de alteração no aspecto da estrutura, no diafragma e neovascularização.

$$2: TA \times IA = 3 \times 4 + 1 / AG = 0$$

$$3: TA \times IA = 4 \times 5 + 2 / AG = 2$$

**Figura 33:** Rato 1 do grupo própolis 300 mg/kg/dia, com aderências entre a gordura epididimal e a cicatriz mediana, entre o fígado e o diafragma e o aglomerado de estruturas que acomete a parede abdominal de hipocôndrio esquerdo, o fígado, o estômago, o epíplon e o baço, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



Fonte: Autoria própria.

## 6.2 Grupo Própolis 300 mg/kg/dia - Rato 02

O rato 02 (figura 34) deste grupo apresentava aderências peritoneais entre o fígado, o estômago e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, esse animal pontuava com 34 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Ausência de aderências envolvendo a parede abdominal. Presença de alterações morfológicas nos quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: alteração no aspecto da estrutura, neovascularização (exceto 8') e corpo estranho (fio de sutura).

$$2': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

$$5': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

$$8': TA \times IA = 0 / AG = 2$$

Abdome: Em quadrante 1 presença de aderência pontual entre o epíplon e o fígado, agravada com neovascularização associado a focos de neovascularização em epíplon, fora da área da aderência. Em quadrante 2 presença de aderência entre o fígado, o estômago e o epíplon, agravada com neovascularização e acometendo menos da metade da superfície do fígado. Fora da área de aderência deste quadrante haviam focos de neovascularização e corpo estranho (fio de sutura). Em quadrante 3 aderência entre o fígado, o epíplon e o estômago. No quadrante 9, presença de área de neovascularização sobre alça intestinal.

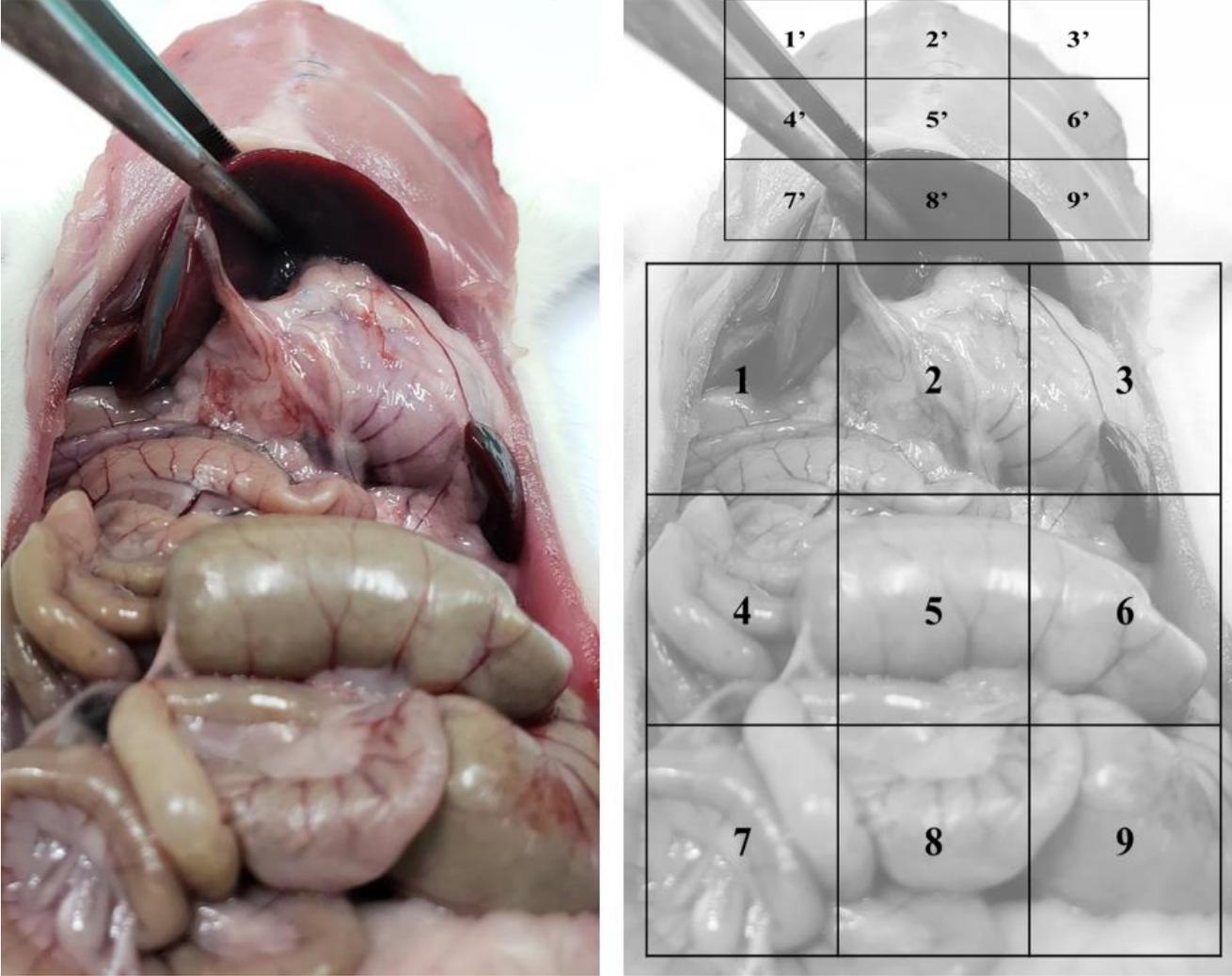
$$1: TA \times IA = 2 \times 1 + 1 / AG = 1$$

$$2: TA \times IA = 3 \times 3 + 1 / AG = 2$$

$$3: TA \times IA = 3 \times 3 / AG = 0$$

$$9: TA \times IA = 0 / AG = 1$$

**Figura 34:** Rato 2 do grupo própolis 300 mg/kg/dia, com aderências entre o fígado e o epíplon e outra área entre o fígado, o estômago e o epíplon, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



**Fonte:** Autoria própria.

### 6.3 Grupo Própolis 300 mg/kg/dia - Rato 03

O rato 03 (figura 35) deste grupo não possuía aderências, sendo graduado com zero pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, esse animal pontuava com 12 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Ausência de aderências envolvendo a parede abdominal. Presença de alterações morfológicas nos quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: alteração no aspecto da estrutura, neovascularização e corpo estranho (fio de sutura).

2': TA x IA = 0 / AG = 3

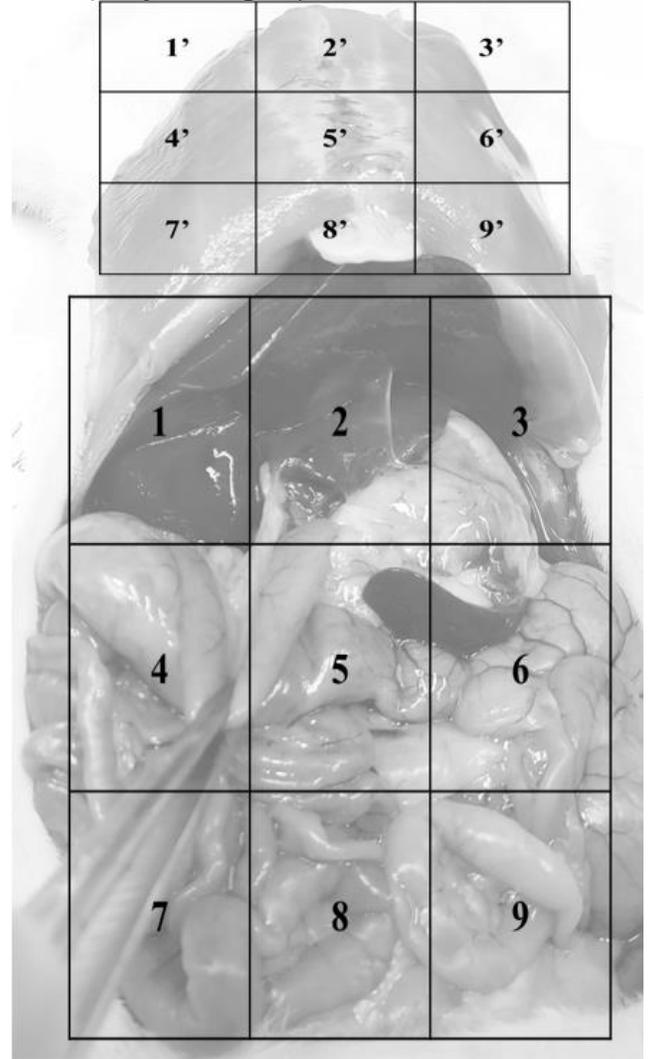
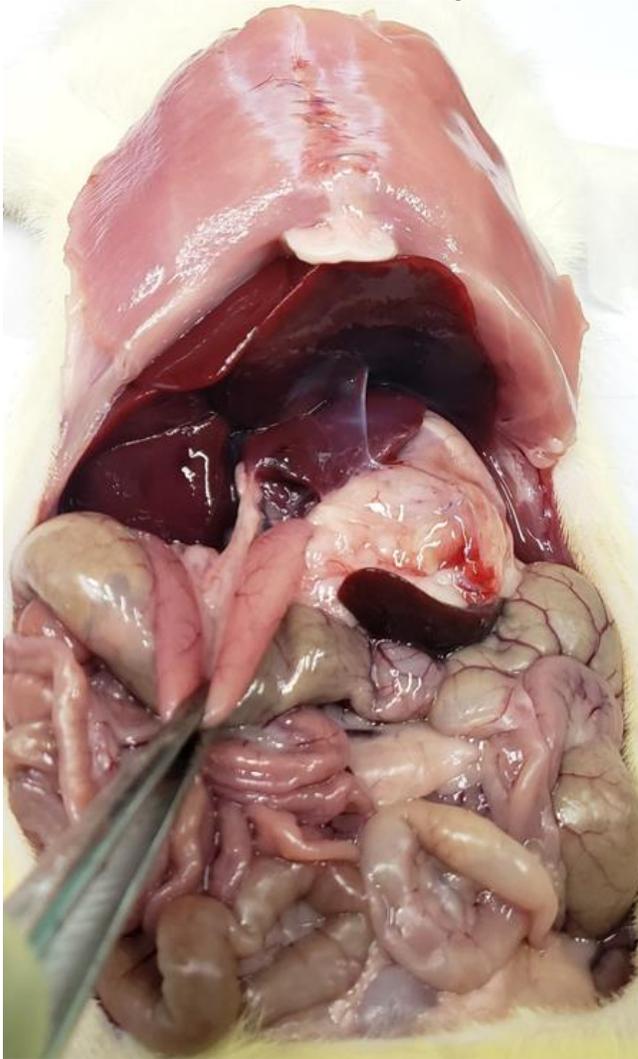
5': TA x IA = 0 / AG = 3

8': TA x IA = 0 / AG = 3

Abdome: Em quadrante 2 presença de focos de neovascularização, alteração no aspecto da estrutura e corpo estranho (fio de sutura).

2: TA x IA = 0 / AG = 3

**Figura 35:** Rato 3 do grupo própolis 300 mg/kg/dia, com aderência pontual entre o fígado e o epíplon, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



Fonte: Autoria própria.

#### 6.4 Grupo Própolis 300 mg/kg/dia - Rato 04

O rato 04 (figura 36) deste grupo apresentava aderência entre o fígado, o estômago e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, esse animal pontuava com 33 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Ausência de aderências envolvendo a parede abdominal. Presença de alterações morfológicas nos quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: alteração no aspecto da estrutura, neovascularização (exceto 8') e corpo estranho (fio de sutura).

$$2': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

$$5': TA \times IA = 0 / AG = 3$$

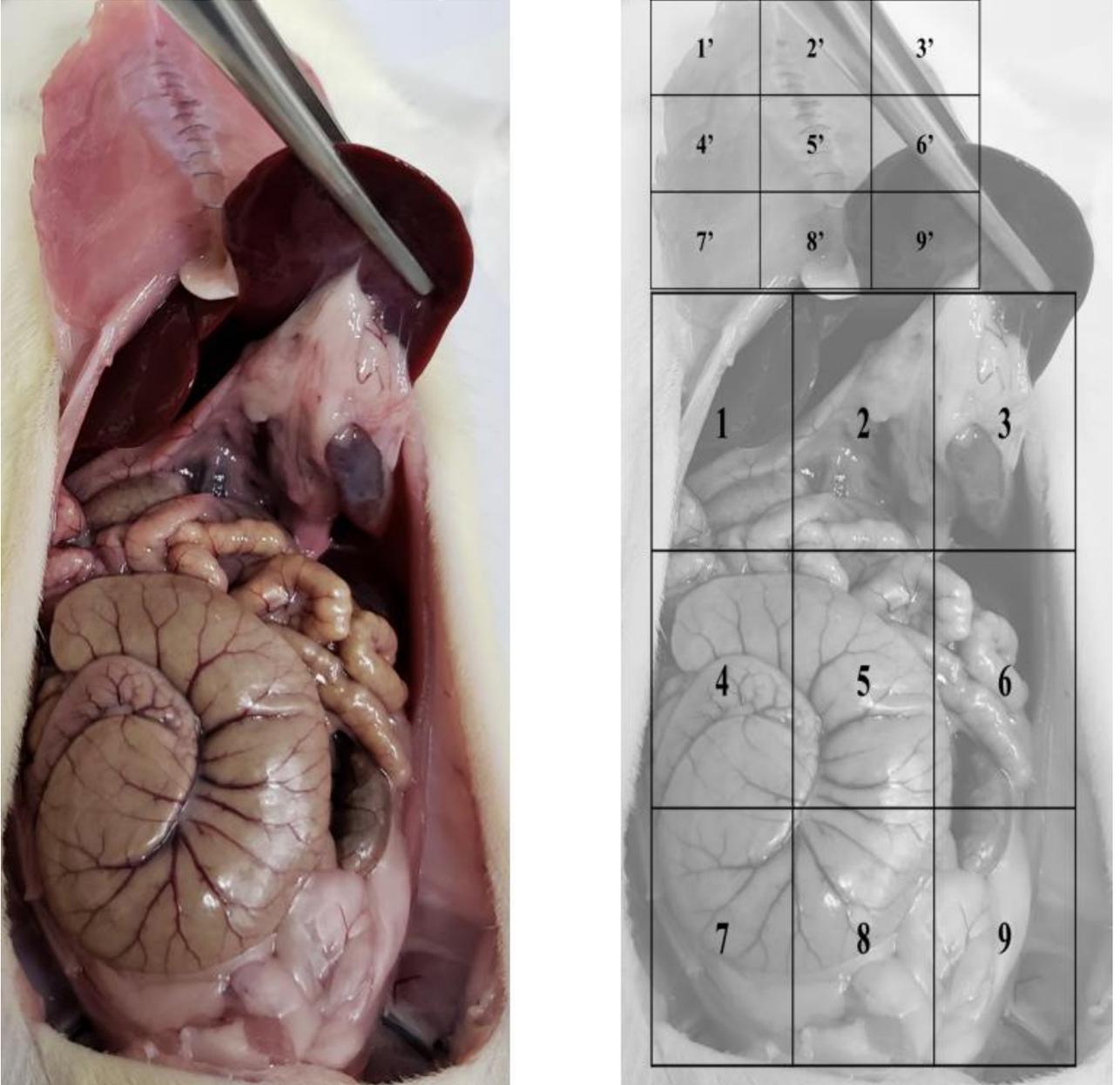
$$8': TA \times IA = 0 / AG = 2$$

Abdome: Em quadrante 2 presença de aderência entre o fígado, o estômago e o epíplon, que ocupava menos da metade da superfície do fígado. Em quadrante 3 presença de aderência entre o fígado, o estômago e o epíplon, que ocupava mais da metade da superfície do fígado agravada com neovascularização e corpo estranho (fio de sutura). Fora da área de aderência no quadrante 3 haviam focos de neovascularização e alteração no aspecto da estrutura (área de fibrina cobrindo polo inferior do baço).

$$2: TA \times IA = 3 \times 3 / AG = 0$$

$$2: TA \times IA = 3 \times 4 + 2 / AG = 2$$

**Figura 36:** Rato 4 do grupo própolis 300 mg/kg/dia, com aderência entre o fígado, o estômago e o epíplon, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



Fonte: Autoria própria.

### 6.5 Grupo Própolis 300 mg/kg/dia - Rato 05

O rato 05 (figura 37) deste grupo apresentava aderência entre o fígado, o estômago e o epíplon, sendo graduado com três pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, esse animal pontuava com 30 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Ausência de aderências envolvendo a parede abdominal. Presença de alterações morfológicas nos quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: alteração no aspecto da estrutura, neovascularização (exceto 2') e corpo estranho (fio de sutura). Em quadrante 1' presença de foco de hematoma em parede, que poderia ter sido decorrente da punção para anestesia intraperitoneal.

1': TA x IA = 0 / AG = 1

2': TA x IA = 0 / AG = 2

5': TA x IA = 0 / AG = 3

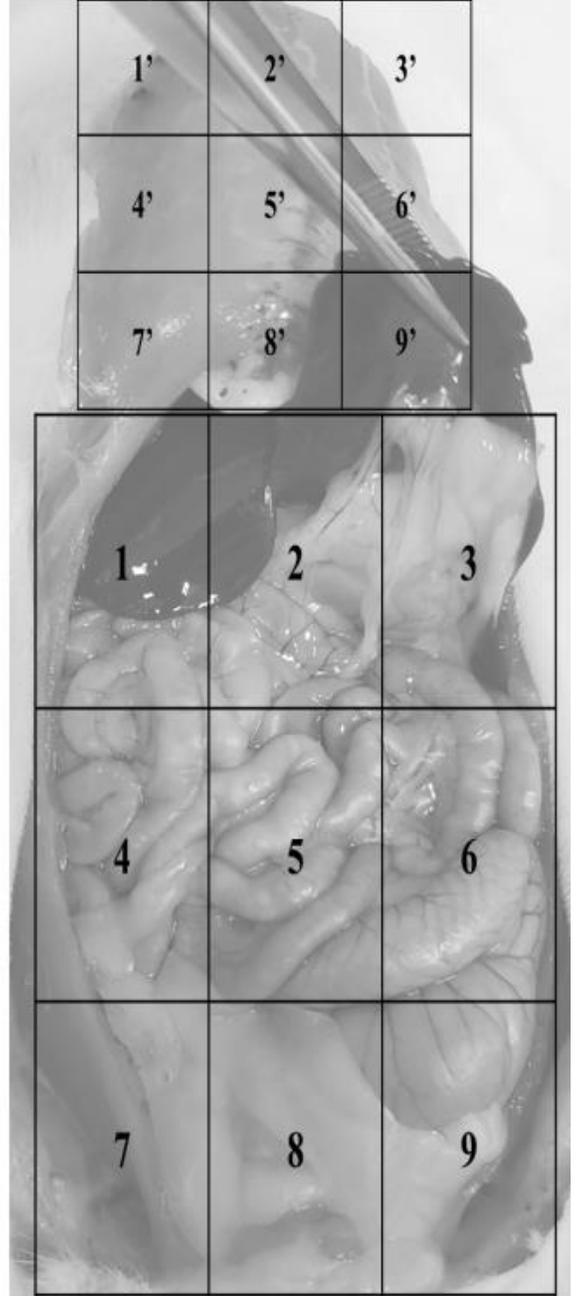
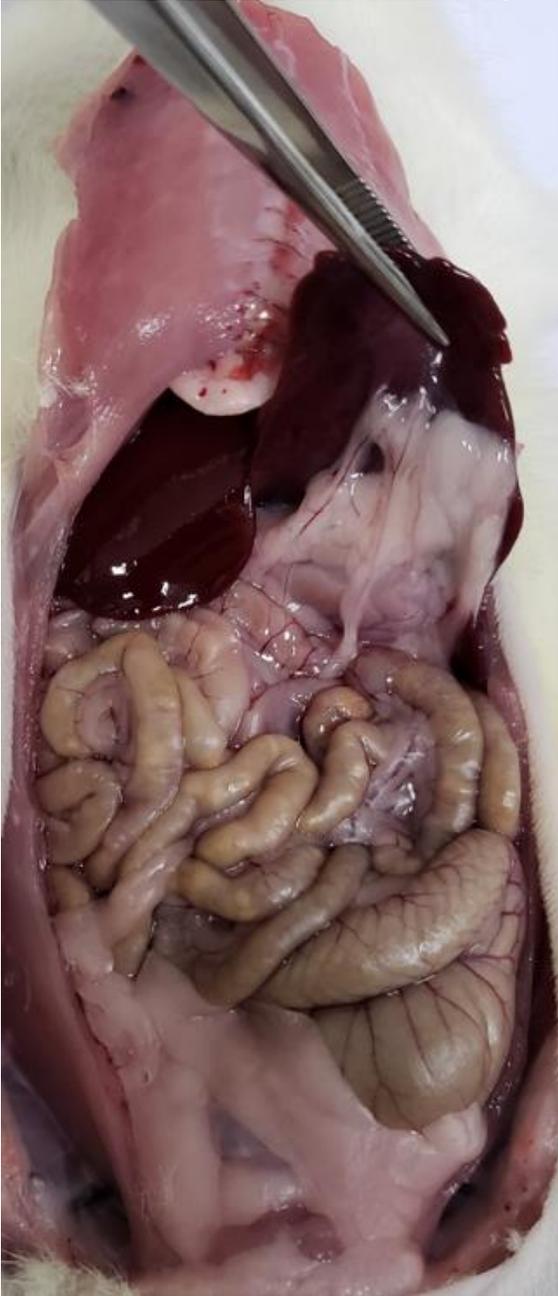
8': TA x IA = 0 / AG = 3

Abdome: Em quadrante 2 presença de aderência entre o fígado, o estômago e o epíplon, que ocupava menos da metade da superfície do fígado. Em quadrante 3 presença de aderência entre o fígado, o estômago e o epíplon, que ocupava mais da metade da superfície do fígado.

2: TA x IA = 3 x 3 / AG = 0

2: TA x IA = 3 x 4 / AG = 0

**Figura 37:** Rato 5 do grupo própolis 300 mg/kg/dia, com aderência entre o fígado, o estômago e o epíplon, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



**Fonte:** Autoria própria.

## 6.6 Grupo Própolis 300 mg/kg/dia - Rato 06

O rato 06 (figura 38) deste grupo apresentava ausência completa de aderências peritoneais, sendo graduado com zero pontos tanto na escala de Evans<sup>(62)</sup> quanto na escala de Nair<sup>(10)</sup> (tabelas 4 e 6 do texto), mas quando avaliado segundo a tabela quantificável desta pesquisa, esse animal pontuava com 13 pontos explicados a seguir e o resultado inserido na tabela 8 do texto:

Parede: Ausência de aderências envolvendo a parede abdominal. Presença de alterações morfológicas nos quadrantes 2', 5' e 8', que apresentavam: alteração no aspecto da estrutura, neovascularização (exceto 8') e corpo estranho (fio de sutura).

2': TA x IA = 0 / AG = 3

5': TA x IA = 0 / AG = 3

8': TA x IA = 0 / AG = 2

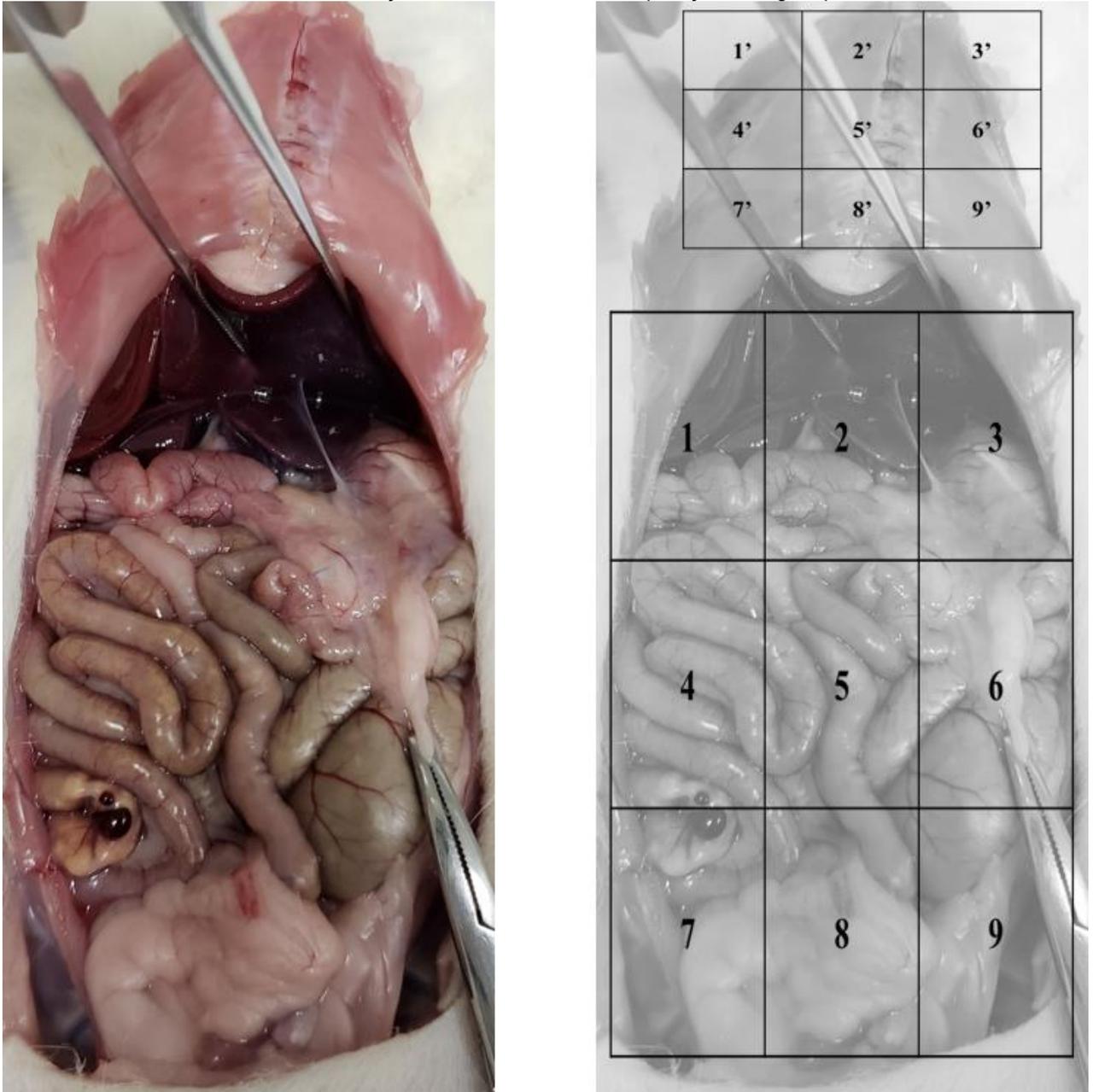
Abdome: Ausência de aderências peritoneais. Em quadrante 3 presença de alteração no aspecto da estrutura, no estômago, sendo notada alteração referente a gastrotomia com gastrorrafia, associado a corpo estranho (fio de sutura) e diminutos focos de neovascularização. Em quadrante 7 presença de hematomas em alça de delgado que pode ter sido decorrente da punção para a anestesia intraperitoneal. Em quadrante 8 presença de foco de neovascularização em gordura epididimal.

3: TA x IA = 0 / AG = 3

7: TA x IA = 0 / AG = 1

8: TA x IA = 0 / AG = 1

**Figura 38:** Rato 6 do grupo própolis 300 mg/kg/dia, com aderência pontual entre o fígado e o epíplon, associadas as alterações decorrentes da manipulação cirúrgica prévia.



Fonte: Autoria própria.

## ANEXOS

## ANEXO A - APROVAÇÃO DA CEUA.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO – UFRJ  
Centro de Ciências da Saúde - CCS

Rio de Janeiro, 12 de dezembro de 2017

Prezado Professor José Eduardo Ferreira Manso

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro registrada no Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o número de processo 01200.001568/2013-87 certifica que o projeto intitulado: “O uso do própolis verde e seus efeitos em modelo animal de aderência peritoneal.”, protocolo nº 104/17, sob sua responsabilidade que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais para fins de pesquisa científica (ou ensino) encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovado por esta comissão de ética, em reunião do dia 08/11/2017.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência do Projeto	Até 12/03/2018
Espécie/linhagem	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar
Nº de animais	9 animais
Peso/idade	250g / 8 meses
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério do Centro de Cirurgia Experimental - CCS - Bloco J - UFRJ

Atenciosamente;

Prof. Marcel Frajblat  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CCS

## **ANEXO B - DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS DO PROPOLIS UTILIZADO NA PESQUISA.**

### **Determinação de flavonoides totais expressos em quercetina**

#### Preparo do Reagente Cloreto de Alumínio 5,0% (p/v)

Em um béquer de 100,0 ml, foram pesadas 5,0 g de cloreto de alumínio (L.21706, Cinética). Em capela, foram adicionados 50,0 – 70,0 ml de metanol (grau analítico). Posteriormente a solução foi agitada até a completa dissolução, e transferida para balão volumétrico de 100,0 ml, lavando o béquer. O volume foi completado com metanol.

#### Preparo do Padrão

Em balão volumétrico de 10,0 ml foram pesadas 3,0 mg do padrão primário quercetina (L.89262, PhytoLab, Germany) e adicionados 7,0 ml metanol (grau analítico). Foi homogeneizado em vórtice até solubilização e seu volume foi completado com metanol. A partir dessa solução foram preparadas cinco soluções padrão de trabalho de níveis de concentrações 4,80; 5,40; 6,00; 6,60 e 7,20 µg/ml em metanol.

#### Preparo da Amostra

Foram pesadas 100,0 mg da amostra em balão volumétrico de 25,0 ml e adicionados 15,0 ml de metanol (grau analítico). A amostra foi submetida à extração em banho ultrassom, por 1 hora. Após, o volume foi completado com metanol e filtrado em papel filtro. Em seguida, foi transferida uma alíquota de 1,0 ml desta solução para um balão volumétrico de 25,0 ml, contendo 10,0 ml de metanol, e acrescentado 0,5 ml do reagente de cloreto de alumínio 5% (p/v). O volume foi completado com metanol. O ensaio foi realizado em triplicata.

#### Condições espectrofotométricas

Foi utilizado um espectrofotômetro (Shimadzu, UV 1240), no comprimento de onda de 425 nm. O equipamento foi zerado com metanol e, para a leitura das absorbâncias, foi utilizada uma cubeta de quartzo.

## Determinação de compostos fenólicos e derivados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Preparo da Fase Móvel - Água acidificada com ácido fórmico 0,1% (v/v)

Em um balão volumétrico de 1000,0 ml contendo 500 ml de água Milli-Q foi adicionado 1,0 ml de ácido fórmico e homogeneizado. O volume foi completado com água Milli-Q (pH = 2,7) e esta solução foi filtrada a vácuo utilizando membrana para filtração de 0,45 µm.

Preparo dos Padrões

As substâncias químicas de referência utilizadas, foram preparadas em soluções padrão de trabalho em metanol (grau HPLC) nas concentrações: ácido cafeico (1,0 – 16,0 µg/ml) (Sigma-Aldrich, L: SLBZ6416), ácido p-cumárico (5,0 – 80 µg/ml) (Sigma-Aldrich, L: 091M119V), ácido 3,5-dicafeoilquínico (3,5-DCQ) (24,0 – 36,0 µg/ml) (Phytolab, L: 3215), ácido 4,5-dicafeoilquínico (4,5-DCQ) (36,0 – 48,0 µg/ml) (Phytolab, L: 9943), galangina (Sigma-Aldrich: BCCG2648), artepelin C (10,0 – 160,0 µg/ml) (Phytolab, L: 111674647), sendo que crisina, aromadendrina-4'-O-metil-éter (2 – 32 µg/ml), drupanina (12,0 – 48 µg/ml) e bacharina (9,0 – 33,0 µg/ml) foram previamente isoladas e identificadas pelos autores, como descrito por Sousa et al.<sup>(70)</sup> e gentilmente cedido por eles.

Preparo da Amostra

Foram pesadas 20,0 mg da amostra em balão volumétrico de 10,0 ml e adicionados 5,0 ml de metanol (grau HPLC). A amostra foi submetida à extração em banho ultrassom, por 10 minutos. Após, o volume foi completado com fase móvel (ácido fórmico 0,1% v/v) e filtrado em filtro membrana 0,45 µm diretamente em vial. O ensaio foi realizado em triplicata.

Condições cromatográficas

Foram pesadas 20,0 mg da amostra em balão volumétrico de 10,0 ml e adicionados 5,0 ml de metanol (grau HPLC). A amostra foi submetida à extração em banho ultrassom, por 10 minutos. Após, o volume foi completado com fase móvel (ácido

fórmico 0,1% v/v) e filtrado em filtro membrana 0,45 µm diretamente em vial. O ensaio foi realizado em triplicata.

Foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência da marca Shimadzu, com controlador CBM-20A, bomba quaternária LC-20AT, detector de arranjo de diodos SPD-M 20A e software Shimadzu LC versão 1.21 SP1. Uma coluna Shimadzu Shim-Pack CLC-ODS (4,6 mm × 250 mm, diâmetro de partícula de 5 µm e diâmetro de poro de 100 Å) foi utilizada. A fase móvel consistiu de metanol (B) e água ácida com ácido fórmico (0,1% v/v) (A). O método consistiu em um gradiente linear de 20-95% de B durante um período de 77 min a uma taxa de fluxo de 0,8 ml/min. O volume de injeção foi de 10 µl. O forno da coluna foi regulado para 40°C. A detecção foi definida em 275 nm, conforme previamente publicado por Berretta et al.<sup>(29)</sup>.