

JOSE LUIZ FONTOURA DE ANDRADE

Efeito da oxigenioterapia hiperbárica na cicatrização de anastomoses de cólon esquerdo com e sem isquemia induzida em ratas: avaliação clínica, biomecânica e histopatológica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre

Área de concentração: Ciências aplicadas à Saúde

Orientador: Prof. Dr. João Batista de Sousa

Brasília - DF

2019

JOSE LUIZ FONTOURA DE ANDRADE

Efeito da oxigenioterapia hiperbárica na cicatrização de anastomoses de cólon esquerdo com e sem isquemia induzida em ratas: avaliação clínica, biomecânica e histopatológica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof Dra Andréa Pedrosa Ribeiro Alves Oliveira

Prof. Dr. João Batista de Sousa

Prof. Dr. Paulo Gonçalves de Oliveira

Suplente:

Profa. Dra. Ana Lúcia da Silva

DEDICATÓRIA

A meu pai, que pelo exemplo sempre me guiou no caminho da retidão.

À minha mãe, que inspirou todos seus filhos o amor pelo estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me ajudaram na realização deste trabalho:

Ao Professor Dr. João Batista de Sousa, Professor Associado de Clínica Cirúrgica da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, pela orientação segura e por sua habilidade em ensinar sem dar a resposta pronta, mas sempre provocando a reflexão e indicando o caminho.

Ao Capitão de Corveta Médico Leonardo Mendes Pinto, Chefe da Seção de Medicina Hiperbárica do Hospital das Forças Armadas, por ter sido parceiro nessa empreitada, por ter aberto as portas da Medicina Hiperbárica e ter tornado possível a realização desse experimento.

Aos membros da equipe de Medicina Hiperbárica do Hospital das Forças Armadas: SO-MG-MEC Stenio Batista Pinto de Souza, SGT-EF Reginaldo José Costa, 1º SGT-EF Alessandro Ericsson de Oliveira, SO-EF Elias Pereira de Lacerda, 1º SGT-EF Glauber Antonio Souza da Silva e a servidora civil Inês de Souza Sarti pelo apoio para realização de todas as sessões hiperbáricas, inclusive em finais de semana e feriados e pelos ensinamentos e camaradagem.

Ao neurocirurgião Marco de Agassiz Almeida Vasques pela generosa contribuição participando em todas as operações.

À servidora Civil Vera Lúcia Costa de Queiroz, técnica de enfermagem do Laboratório de Cirurgia Experimental do Hospital das Forças Armadas pela valiosa ajuda, desdobrando-se em muitas para que tudo desse certo, para que todas as dificuldades fossem superadas.

À professora Doutora Fabiana Pirani Carneiro, Professora Adjunta da Universidade de Brasília, pela análise histológica, fotografias das lâminas apresentadas nesta dissertação, pelos ensinamentos e orientações.

À servidora Tercia Lousa de Castro pelas orientações, por seu trabalho e pelo agradável convívio no laboratório de Patologia.

Ao Médico Veterinário do Laboratório de Cirurgia experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Dr. Rafael Rocha de Andrade, pelo apoio e ensinamentos.

Ao meu irmão Luís Olavo Fontoura de Andrade, pelo estímulo para que eu perseguisse este sonho.

À minha namorada Tatiane Alves Lima, por seu carinho, por sua paciência infinita e por seu suporte incondicional em todos momentos.

RESUMO

Introdução - A deiscência anastomótica é causa relevante de morbidade e mortalidade em cirurgia colorretal. Várias intervenções têm sido propostas a fim de diminuir a incidência de vazamento anastomótico e dentre elas a oxigenioterapia hiperbárica. Alguns autores já demonstraram benefícios dessa terapêutica na cicatrização de anastomoses, contudo faltam evidências para estabelecer se há melhores protocolos de sessões de oxigenioterapia hiperbárica. **Objetivo** - Verificar possíveis efeitos de um protocolo de sessões de oxigenioterapia hiperbárica realizadas no período perioperatório na evolução clínica e na cicatrização do sítio de anastomose no cólon esquerdo com e sem isquemia induzida em ratos. **Material e Método** - O protocolo de oxigenioterapia hiperbárica consistiu de duas sessões antes e de três sessões após a operação de hiperóxia a 100% a 2,4 Atmosfera absoluta. Quarenta ratos foram aleatoriamente distribuídas em quatro grupos com dez animais cada. Todos animais passaram por ressecção de segmento de 1 cm do cólon esquerdo seguida de anastomose término-terminal e reoperação no quarto dia pós-operatório. Os animais do grupo controle (G Contr) passaram também pela simulação de isquemia e de sessão de oxigenioterapia hiperbárica. Os animais grupo oxigenioterapia hiperbárica (G OTH) receberam essa terapêutica e passaram por simulação de isquemia. Os animais do grupo isquemia e oxigenioterapia hiperbárica (G Isq/OTH) foram submetidos às sessões de oxigenioterapia e à isquemia. Os animais do grupo isquemia (G Isq) foram submetidos apenas à indução de isquemia e não receberam oxigenioterapia hiperbárica. Segmento de três centímetros localizado a partir de dois centímetros cranial a placa de Peyer da reflexão peritoneal era isolado e a isquemia era induzida por eletrocoagulação dos vasos. A seguir, era ressecado um centímetro do terço médio desta porção desvascularizada. Nos animais dos grupos G Contr e G OTH, as mesmas medidas foram tomadas para ressecção de mesmo segmento, mas apenas a simulação de indução de isquemia foi realizada. Os parâmetros de avaliação foram a evolução clínica, a mortalidade, a variação ponderal, o aspecto macroscópico da cavidade abdominal no dia da eutanásia, a medida da força de ruptura da linha de anastomose e o estudo histopatológico. **Resultados** - Houve quatro óbitos, dois animais do grupo isquemia e dois do grupo controle, três durante anestesia e um na véspera da reoperação. Apenas animais do grupo isquemia apresentaram fístula 2/8 (25%), enquanto nenhum animal do Grupo Isq/OTH 0/10 apresentou essa complicação. Quando os eventos mortalidade e fístula são analisados, observa-se que não houve diferença estatisticamente significativa entre os quatro grupos experimentais. Entretanto, houve diferença estatisticamente significativa quando são estudados os animais que passaram pela oxigenioterapia hiperbárica independente de isquemia, com animais que não foram submetidos a essa terapêutica. Os eventos morte e de fístula não ocorreram nos animais submetidos a oxigenioterapia hiperbárica ($p=0,036$). Medianas e valores de primeiro e de terceiro quartil no primeiro dia do experimento para peso foram: no G Contr 219g (209-237,25); no G Isq 218,50g (212,50-243,75); no G Isq/OTH 220g (215,75-226,25) e no G OTH 222g (218,50-230). No sétimo dia do experimento, mediana do peso e valores de primeiro e de terceiro quartil foram G Contr 206g (193,25-216); G Isq 198,50 (193,50-222); G Isq/OTH 202g (196,50-214); G OTH 208g (193,25-213). Não houve diferença estatisticamente significativa da perda ponderal relativa entre os grupos $p=0,921$ nem do peso no dia 1 $p=0,619$; nem do peso no sétimo dia $p=0,990$. Todos animais perderam peso entre o primeiro e o sétimo dia do experimento. A perda de peso em cada grupo foi estatisticamente significativa mas a variação ponderal foi semelhante nos quatro grupos. As medianas e valores de primeiro quartil e de terceiro quartil nas medidas de força de ruptura em Newtons foram G Contr 0,03N (0,00-0,006); G Isq 0,03N (0,01-0,015); G Isq/OTH 0,13N (0,07-0,27); G OTH 0,02N (0,01-0,023). Nas medidas de força de ruptura não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais. **Conclusão** - Nas condições em que este estudo foi realizado e baseado nos resultados obtidos, o protocolo de oxigenioterapia hiperbárica não interferiu na cicatrização de anastomose colônica pelos parâmetros histopatológicos e biomecânicos. Entretanto a formação de fístula e mortalidade não ocorreram nos animais que foram submetidos a oxigenioterapia hiperbárica. Isso sugere que a oxigenioterapia hiperbárica pode ter protegido os animais desses dois eventos.

Palavras-chave: anastomose. Cólon. oxigenioterapia hiperbárica. cicatrização, força de ruptura.

ABSTRACT

Introduction - Anastomotic dehiscence is a relevant cause of morbidity and mortality in colorectal surgery. Several interventions have been proposed in order to reduce the incidence of anastomotic leakage and among them hyperbaric oxygen therapy. Some authors have already demonstrated benefits of hyperbaric oxygen therapy in the healing of anastomosis, but the best protocol for hyperbaric oxygen therapy sessions remains yet to be established. **Objective** - To verify the possible effects of a protocol of hyperbaric oxygen therapy sessions conducted in the perioperative period on clinical evolution and healing of the anastomosis site in the left colon with and without induced ischemia in female rats. **Material and Method** - The protocol of hyperbaric oxygen therapy consisted of two sessions before and three sessions after the operation of hyperoxia at 100% to 2.4 Absolute Atmosphere. Forty female rats were randomly assigned to four groups with ten animals each. All animals underwent segment resection of one cm of the left colon followed by end-to-end anastomosis and reoperation on the fourth postoperative day. The animals of the Control Group (G Contr) also underwent the simulation of ischemia and hyperbaric oxygen therapy session. The animals of the hyperbaric oxygen therapy Group (HBOT) received this therapy and underwent simulation of ischemia. The animals of the ischemia and hyperbaric oxygen therapy Group (Isch/HBOT) were submitted to oxygen therapy sessions and to ischemia. The animals of the Ischemia Group (Isch) were submitted only to the induction of ischemia and did not receive hyperbaric oxygen therapy. A segment of the length of three centimeters located two centimeters apart of the peritoneal reflection Peyer's plaque was isolated and ischemia was induced by electrocoagulation of the vessels. Then one centimeter of the middle third of this devascularized portion was resected. The same measurements were taken for resection of the same segment in the animals of both Contr and HBOT groups, but only the simulation of induction of ischemia was conducted. The evaluation parameters were clinical evolution, mortality, ponderal variation, macroscopic appearance of the abdominal cavity on the day of euthanasia, measurement of the bursting strength of the anastomosis line and histopathological study. **Results** - There were four deaths, two animals from the Ischemia Group and two from the Control Group, three during anesthesia and one on the day before reoperation. Only animals from the ischemia group presented fistula 2/8 (25%), whereas no animals from the Isch/HBOT group 0/10 presented this complication. There was no statistically significant difference between the four experimental groups when mortality and fistula events were analyzed. However, there was a statistically significant difference when the animals that underwent hyperbaric oxygenation independent of ischemia are compared with animals that were not submitted to this therapy. Death and fistula events did not occur in any animals submitted to hyperbaric oxygen therapy ($p = 0.036$). Median (first quartile-third quartile) weight on the first day of experiment was as follows: Control group, 219 g (209-237.25); Ischemia group, 218.50 g (212.50-243.75); Ischemia/HBOT group, 220 g (215.75-226.25); and HBOT group, 222 g (218.50-230). On the seventh day of the experiment, weight had decreased to 206 (193.25-216) g in the Control group; 198.50 (193.50-222) g in the Ischemia group; 202 (196.50-214) g in the HBOT/Ischemia group; and 208 (193.25-213) g in the HBOT group. There was no statistically significant difference in relative ponderal loss between groups ($p = 0.921$) nor on first day weight ($p = 0.619$); nor on the weight at the seventh day ($p = 0.990$). All animals lost weight between the first and seventh day of the experiment. The weight loss in each group was statistically significant but the weight variation was similar in the four groups. The medians (first quartile-third quartile) in the measures of bursting strength in Newtons were Contr 0.03N (0.00-0.006); Isch G 0.03N (0.01-0.015); Isch/HBOT 0.13N (0.07-0.27); HBOT 0.02N (0.01-0.023). There was no statistically significant difference in the measures of bursting strength between the experimental groups. **Conclusion** - Under the conditions in which this study was conducted and based on the results obtained, the protocol of hyperbaric oxygen therapy did not interfere in the histopathological and biomechanical parameters of healing of colonic anastomosis. However, the formation of fistula and mortality did not occur in the animals exposed to hyperbaric oxygen therapy. This suggests that hyperbaric oxygen therapy could have protected animals from these two events.

Key words: anastomosis. Colon. hyperbaric oxygen therapy. healing, bursting strength

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Câmara Hiperbárica monoplace com animais em caixas plásticas com múltiplas perfurações.	22
Figura 2 - Detalhe da operação com uso de microscópio cirúrgico	24
Figura 3 - Equipamentos utilizados, mesa cirúrgica, microscópio, aparelho de anestesia, eletrocoagulador, manta de aquecimento e cubas.....	25
Figura 4 - Detalhe da operação com apoio do auxiliar, microscópio cirúrgico e instrumental de microcirurgia.	27
Figura 5 - Fístula no animal 317 , comunicação entre luz do cólon e cavidade destacadas com as setas	39
Figura 6 - Microscopia da cicatriz. Colágeno (seta laranja), fibroblasto (seta verde) e neovascularização (asterisco amarelo). (HE, 200X)	42
Figura 7 - Microscopia da cicatriz. Ulceração (asterisco amarelo). (HE, 40 X).....	47
Figura 8 - Microscopia da cicatriz. Crosta fibrinoleucocitária (asterisco azul) na úlcera. (HE, 40 X).....	48
Figura 9 - Microscopia da cicatriz. Necrose isquêmica da mucosa (asterisco amarelo). (HE, 100X).	49
Figura 10 - Microscopia da cicatriz. Microabscesso neutrofílico (asterisco azul). (HE, 200 X).....	51
Figura 11 - Microscopia da cicatriz. Colônias bacterianas (asterisco verde). (HE, 200 X).....	52
Figura 12 - Microscopia da cicatriz. Corpo estranho (asterisco vermelho). (HE, 200 X).....	53
Figura 13 - Microscopia da cicatriz. Bordas unidas (A) e separadas (B). Mucosa (asterisco amarelo) (HE, 40 X).....	54
Figura 14 - Microscopia da cicatriz. Reepitelização (seta azul) (HE, 100 X).	55

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Pesos em gramas por grupo e por dia, no primeiro dia e no sétimo dia do experimento.....	34
Gráfico 2 - Escore médio por grupo do critério cromodacriorreia.....	35
Gráfico 3 - Escore médio por grupo e por dia após cirurgia no critério redução de atividade.....	35
Gráfico 4 - Escore médio por grupo e por dia após operação no critério afundamento de flancos.....	36
Gráfico 5 – Frequência relativa de animais por grupo, por quantidade de fístula e por quantidade de aderências pelo escore de Nair	38
Gráfico 6 - Valores de força de ruptura do cólon expressos em newtons por grupo experimental.....	41
Gráfico 7 - Frequência relativa entre os grupos no item ulceração da análise histopatológica.	47
Gráfico 8 – Frequência relativa de crosta fibrinoleucocitária por grupo experimental.	48
Gráfico 9 - Frequência relativa necrose isquêmica por grupo experimental.....	50
Gráfico 10 – Frequência relativa de microabscesso por grupo experimental.....	51
Gráfico 11 - Frequência relativa da presença de colônias bacterianas por grupo experimental.....	52
Gráfico 12 – Frequência relativa corpo estranho nos grupos experimentais.....	53
Gráfico 13 - Frequência relativa separação das bordas da ferida da operação.	54
Gráfico 14 - Frequência relativa de reepitelização nas bordas da ferida da operação entre grupos.	55
Gráfico 15 – Gráfico de caixa de tempos de cirurgia por grupo.	56
Gráfico 16 - Duração de operação por grupo experimental na sequência em que foram realizados.....	56

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Denominação e descrição dos procedimentos dos grupos experimentais	22
Quadro 2 - Linha de tempo do experimento	24
Tabela 3 - Valores estatísticos da força máxima de ruptura em newtons	40
Tabela 4 – Frequência relativa de resultados por grupos e por parâmetros avaliados em ausente, leve, moderado e acentuado, frequências que foram zero em todos os grupos não foram listados na tabela.	43
Tabela 5 Comparação entre os grupos critérios histopatológicos avaliados como ausente(0), leve (1), moderado (2) e acentuado (3).....	44
Tabela 6 - Histopatologia por grupo e por achado em porcentagem de critérios avaliados em ausente ou presente.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ARRIVE	Animal Research: Reporting in vivo experiments
ATA	Atmosphere absolute pressure
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
cm	centímetro
FELASA	Federation of Laboratory Animal Science Association
G Contr	Grupo controle
G Isq	Grupo Isquemia
G Isq/OTH	Grupo Isquemia e oxigenioterapia hiperbárica
G OTH	Grupo oxigenioterapia hiperbárica
Gr Lib	Graus de Liberdade
HFA	Hospital das Forças Armadas
OTH	Oxigenioterapia Hiperbárica
UnB	Universidade de Brasília
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 OBJETIVO	17
3 Material e método	18
3.1 PILOTO	18
3.2 EXPERIMENTO PRINCIPAL	18
3.3 ALOJAMENTO	19
3.4 Alimentação.....	19
3.5 ACLIMATAÇÃO.....	20
3.6 CONTENÇÃO	21
3.7 DENOMINAÇÃO dos GRUPOS EXPERIMENTAIS	21
3.8 Oxigenioterapia hiperbárica.....	22
3.9 Procedimento cirúrgico.....	25
3.10 Reoperação.....	28
3.11 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO	29
3.11.1 Avaliação macroscópica na reoperação.....	29
3.11.2 Medida da força de ruptura	30
3.11.3 Estudo Histopatológico.....	30
3.12 evolução clínica e controle ponderal	31
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
4 RESULTADOS	33
4.1 EVOLUÇÃO CLÍNICA	33
4.1.1 Controle ponderal.....	33
4.1.2 Cromodacriorreia.....	34
4.1.3 Avaliação da redução de atividade por grupo	35
4.1.4 Afundamento do Flanco	36
4.2 ÓBITOS.....	36
4.3 AVALIAÇÃO MACROscópica na NECRÓPSIA.....	37
4.4 Resultados combinados de desfechos clínicos relevantes.....	39
4.5 Força de ruptura.....	40
4.6 estudo Histopatológico	41
4.6.1 Ulceração	47
4.6.2 Crosta fibrinoleucocitária	48
4.6.3 Necrose Isquêmica.....	49

4.6.4 Microabscesso	50
4.6.5 Colônias bacterianas	52
4.6.6 Corpo Estranho	53
4.6.7 Separação das Bordas da Ferida da operação	54
4.6.8 Reepitelização nas bordas da ferida da operação	55
4.7 TEMPO DE DURAÇÃO DAS OPERAÇÕES	56
5 DISCUSSÃO	57
6 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
APÊNDICES	70
ANEXOS	93

1 INTRODUÇÃO

Herrmann *et al* estudaram a cicatrização do cólon de 220 ratos desde 3 horas até 1 ano após a operação de anastomose. Esses autores dividiram didaticamente o processo cicatricial do rato em três fases de limites inexatos e sobrepostos no tempo: inflamação e edema (zero a quatro dias); reparação fibrosa proliferativa (três a quatorze dias); e de remodelação e reorganização (dez a cento e oitenta dias)¹.

Na fase inflamatória há infiltração de plaquetas e infiltração e ativação de monócitos e neutrófilos. Na fase proliferativa o evento mais característico é a formação de tecido de granulação, com angiogênese e fibroplasia. Na fase de remodelagem há síntese e remodelação da matriz de colágeno, transformação de fibroblastos em miofibroblastos, aumento da proporção de colágeno de tipo I substituindo colágeno de tipo III, formação de tecido cicatricial fibroso e reepitelização. Na cura por primeira intenção há regeneração epitelial com mínima cicatriz e mínima contração da ferida. A regeneração é reconstituição do tecido original enquanto a cicatriz é o reparo por substituição por tecido cicatricial fibroso. Se haverá regeneração ou formação de tecido cicatricial dependerá da natureza, da extensão e da intensidade da agressão^{1,2}.

A anastomose colônica representa desafio para que haja o máximo de regeneração e mínimo de formação de tecido cicatricial e o perfeito selamento da ferida cirúrgica sem deiscência nem infecção^{3,4}.

As complicações da terapêutica das doenças colorretais que envolvem ressecções e anastomoses têm incidência relevante e são frequentemente graves. Possuem extensões mórbidas variáveis que prolongam o período de internação hospitalar, aumentam substancialmente o custo do tratamento, perpetuam sequelas funcionais e contribuem para indesejável índice de mortalidade. As mais temíveis complicações são: a infecção e a deiscência da anastomose⁵.

A porcentagem de vazamento pelo sítio da anastomose percebido clinicamente varia de 3,4 a 8% e tem sido responsabilizada por um terço das mortes após operação colorretal⁶. Em 2012, Due *et al* relataram que vazamento anastomótico ocorreu em 6,1% (33/538) dos pacientes com anastomose e abscesso intra-abdominal pós-operatório em 2,1% (17/538) dos casos⁷. Reisinger *et al* informaram que a porcentagem do vazamento anastomótico foi em 10% dos

pacientes (8/84) com a mediana da apresentação clínica no sexto dia pós-operatório³.

Vazamentos anastomóticos podem ser classificados como precoces ou tardios. Os que ocorrem até o sexto dia são considerados precoces e, após esse período, tardios. Os fatores de risco para vazamento precoce de anastomose estão relacionados à falha técnica na confecção da anastomose. Já os fatores de risco para o vazamento tardio da anastomose estão relacionados ao processo cicatricial geralmente inerente ao paciente⁴.

Diferentes fármacos têm sido pesquisados com o intuito de diminuir estas complicações. Em 2014, Oines et al publicaram uma meta-análise onde foram levantados⁸ 56 agentes terapêuticos usados, dentre esses apenas sete atenderam critérios de inclusão em sua meta-análise e são eles: o iloprost, um análogo de prostaciclina; o tacrolimus, um imunossupressor; a eritropoietina; o hormônio do crescimento; os inibidores de amplo espectro de metaloproteinase de matriz; o fator de crescimento-1 semelhante à insulina e a oxigenioterapia hiperbárica. Esses agentes terapêuticos experimentalmente aumentaram a pressão necessária para rompimento de anastomose de cólon.

A oxigenioterapia hiperbárica é o uso de oxigênio em pressões maiores do que a pressão atmosférica presente ao nível do mar. A concentração de oxigênio e de outros gases pode ser alterada em uma câmara para vários pacientes, mas não na câmara para um único paciente.

Com relação à oxigenioterapia hiperbárica (OTH), sabe-se que ao nível do mar a concentração plasmática de oxigênio é 3ml/litro, o restante da demanda dos tecidos 60ml de oxigênio por litro de sangue é transportada ligada à hemoglobina. Na pressão de 3 atmosferas absolutas com oxigênio a 100% o oxigênio dissolvido no plasma chega à 60 ml por litro, o que permite suprir a necessidade dos tecidos independente do oxigênio carregado por hemoglobina⁹.

A OTH induz angiogênese por indução e mobilização de células tronco vasculogênicas em locais de cicatrização; através do estresse oxidativo estimula que células tronco produzam e liberem fatores de crescimento no sítio de neovascularização. O estresse oxidativo é induzido principalmente pelo aumento de síntese de óxido nítrico¹⁰.

Nos últimos quarenta anos, a oxigenioterapia hiperbárica tem sido recomendada para extensa variedade de condições médicas, algumas vezes sem

sólida validação científica. De certa forma, isso contribuiu para desenvolver um grau de ceticismo a respeito dos benefícios, embora a eficiência das indicações mais usadas e conhecidas sejam irrefutáveis.

Sessões de oxigenioterapia hiperbárica podem ser usadas como tratamento principal ou adjuvante. As indicações de oxigenioterapia hiperbárica como tratamento principal com sólido embasamento científico são síndrome de descompressão, embolia gasosa arterial, inalação de fumaça e intoxicação por monóxido de carbono. Como tratamento adjuvante podem ser listadas prevenção e tratamento de osteoradionecrose, cicatrização de transplantes de pele graft e flap e mionecrose clostridial. Existem evidências científicas promissoras para osteomielite refratária, lesões induzidas por radiação, lesão isquêmica traumática aguda, falha prolongada de cicatrização e anemia por hemorragia^{9,11}.

Yildiz et al¹², em 2013, relataram experimento no modelo murino, um grupo recebeu o OTH após a operação enquanto outro grupo caracterizado como controle não recebeu. Percebeu-se que no grupo que recebeu a OTH após tratamento de radioquimioterapia foi identificada melhor cicatrização da anastomose com parâmetros mecânicos e bioquímicos do que no grupo controle¹². Esses resultados positivos da OTH na resistência mecânica de anastomoses não foi lograda quando foi testada com presença infecção, com peritonite induzida por ligadura e punção cecal em ratos¹³.

A oxigenioterapia hiperbárica posterior ao procedimento ou quando a lesão já está instalada está bem estabelecida na prática clínica, A abordagem mais comumente estudada até o momento são de sessões de OTH no pós-operatório¹³⁻¹⁷. Entretanto a aplicação prévia tem despertado o interesse de alguns pesquisadores. Benefícios da oxigenioterapia hiperbárica prévia ao procedimento foram relatados em situações clínicas relacionadas com radioterapia^{18,19} e em procedimentos relacionados a lesões neurológicas induzidas experimentalmente em modelos animais^{16,20}; em anastomose de cólon em ratos¹², na indução de choque endotoxêmico em ratos²¹, e na hepatectomia parcial massiva em modelo rato²².

O tratamento antes e depois da operação com oxigenioterapia hiperbárica poderia produzir resultados favoráveis na cicatrização de anastomoses do cólon isoladamente ou em associação com outro fármaco como hormônio do crescimento, iloprost, tracrolimus, eritropoítina e fator de crescimento-1 semelhante à insulina. Há poucos trabalhos disponíveis e não há consenso qual protocolo proporcionaria

melhores efeitos no modelo rato, a fim de angariar suficientes indícios para propor uma pesquisa clínica em humanos. Alguns trabalhos mais recentes propõem mais de uma sessão diária de OTH, duas sessões foram propostas em um trabalho¹² enquanto que em outro estudo foram realizados quatro sessões no primeiro dia e três sessões por dia no período de três dias seguidos⁶. Um trabalho com pacientes submetidos à operação de revascularização do miocárdio propôs apenas uma sessão quatro horas antes do procedimento e obteve resultados favoráveis com melhora da função cardíaca, redução de tempo de tratamento intensivo e limitação de complicações²³.

Um protocolo das sessões envolve a definição da velocidade de pressurização, da pressão máxima, do tempo de permanência na pressão máxima, da velocidade de despressurização, do intervalo entre as sessões e do número de sessões. Com exceção do tratamento da síndrome de descompressão onde o protocolo das sessões é individualizado, a partir das informações das condições de mergulho, os protocolos rotineiramente usados nas indicações clínicas são padronizados de maneira conservadora. Esses protocolos padronizados são bastante seguros e complicações são raras, tais como barotrauma do ouvido médio, interno ou externo, seios nasais e cavidades dentárias.

A intoxicação por oxigênio pode manifestar-se caso o paciente seja exposto por tempo suficiente em situações de hiperóxia, tanto em condições normobáricas quanto hiperbáricas. A quantificação de tempo suficiente é imensamente variável dependendo do modelo animal estudado, mas está mais próximo de dias do que horas de exposição ao oxigênio. Pacientes ventilados mecanicamente em unidades de tratamento intensivo²⁴ e mergulhadores militares de operações especiais²⁵ estão sob risco muito maior do que pacientes submetidos a protocolos de sessões de OTH, que entre as sessões limitadas a minutos ou poucas horas respiram livremente ar ambiente em pressões normobáricas. Pode afetar pulmões, com lesão pulmonar aguda por hiperóxia, ou o sistema nervoso central, cujo sinal mais grave é convulsão, e a visão, com retinopatia reversível.

2 OBJETIVO

Verificar os efeitos de um protocolo de oxigenoterapia hiperbárica pré e pós-operatória na cicatrização de anastomose com e sem isquemia induzida no cólon esquerdo de ratas.

3 MATERIAL E MÉTODO

A execução do experimento foi autorizada pela Comissão de ética no uso de animais do Hospital das Forças Armadas. As orientações “Animal Research: Reporting in vivo experiments” (ARRIVE) foram seguidas para desenho do projeto, execução dos experimentos e redação da dissertação²⁶⁻²⁸. A declaração de conflito de interesses está apresentada no Apêndice CC.

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental do Hospital das Forças Armadas (HFA) e no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília com colaboração do Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (UnB).

Trata-se de estudo experimental com utilização de modelo animal murino com o objetivo de comparar os desfechos de anastomoses normais e isquêmicas entre grupos com e sem oxigenioterapia hiperbárica pré e pós-operatório.

Para a redação do trabalho, foram utilizadas as seguintes normas da Associação Brasileira de Normas Técnicas: NBR 14724 Trabalho Acadêmico; NBR 10520 Citações; NBR 6023 sumário; NBR 6028 Resumo e Abstract. As referências bibliográficas foram listadas no padrão Vancouver²⁹.

3.1 PILOTO

Foram utilizadas seis ratas (*Rattus norvegicus*) oriundas do biotério do HFA da linhagem Wistar para a execução do piloto. O piloto serviu, exclusivamente, para padronizar procedimentos, nenhum dado foi utilizado.

3.2 EXPERIMENTO PRINCIPAL

Foram utilizadas 40 ratas da linhagem LEW/HsdUnib provenientes da Divisão de Produção de Animais Specific Pathogen Free do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório da Universidade Estadual de Campinas.

O programa de monitoramento sanitário do CEMIB/UNICAMP é realizado de acordo com as recomendações internacionais da “Federation of Laboratory Animal Science Association” (FELASA). Os documentos relativos à sanidade dos animais são: certificado de monitoramento de saúde animal (Anexo C), atestados de sanidade animal (Anexos D, E e F) e guias de trânsito animal (Anexos G, H e I).

O peso médio no dia da operação foi de 218,28 g (+/-12,20). A menor idade em dias na data da operação foi de 112, a maior idade foi de 133 dias com mediana de 128 dias (122-134)(Apêndices F e G).

3.3 ALOJAMENTO

Foram acomodadas em blocos de quatro animais, um de cada grupo experimental em gaiolas padronizadas do laboratório do alojamento de animais do HFA. Caixa para ratos de dimensões 41 x 34 x 16cm, com tampa de arame cromado, malha 0,7cm com comedouro embutido em forma de cunha.

As caixas foram forradas com maravalha, que foi autoclavada antes de ser usada. Semanalmente, as ratas eram transferidas para caixas limpas com maravalha nova.

Foram mantidos em temperatura ambiente média de 25,3°C (+/-0,68) e umidade média 48% (+/-8,73), os registros do controle diário e estatísticas estão descritos nos apêndices C e D. Os ciclos de luz/escuridão de 12/12 horas, invertidos com a luz natural, com as luzes desligadas por timer às 8h e ligadas às 20h.

3.4 ALIMENTAÇÃO

Ração e água estiveram disponíveis *ad libitum*, exceto durante as sessões de oxigenioterapia hiperbárica e no jejum imposto 1 hora antes da operação tanto para ração quanto para água³⁰.

Foram alimentados com ração comercial para ratos de laboratório, da empresa Presence Alimentos de Paulínia, SP *ad libitum* (ANEXO L) Foi oferecido *ad libitum* água potável sem tratamento algum, através de bebedouro de polipropileno

de 1000ml, com rolha de borracha antiácida e bico de aço inoxidável reto de 85mm. A oferta *ad libitum* foi garantida pela colocação de dois bebedouros em cada gaiola e pela conferência diária.

Após a operação e após cada sessão de oxigenioterapia hiperbárica, os animais foram colocados em suas gaiolas originais com água e ração à disposição. Quatro dias antes e durante todo pós-operatório, foi ofertada ração inchada em água colocada dentro da caixa, com o objetivo de facilitar acesso e consumo.

3.5 ACLIMATAÇÃO

Os animais foram recebidos em três lotes, o primeiro lote de 16 animais, em 17 de maio; o segundo de 17 animais, em 23 de maio e o terceiro de 7 animais, em 8 de junho de 2017. A aclimatação foi de, pelo menos, 67 dias, da chegada do último lote até o início do experimento com a primeira sessão em 14 de agosto. Todos animais foram agrupados por proximidade de data de nascimento em grupos de 4 (Apêndice F e G).

Microchips de identificação foram implantados em todos animais no mesmo dia. O microchip já identificava a qual grupo experimental o animal seria alocado e foi determinado por sorteio de um animal para cada grupo experimental para cada caixa. O microchip permitiu que os animais fossem manipulados e avaliados identificando a qual grupo experimental pertenciam apenas quando necessário. A diferenciação entre grupos foi estritamente necessária na operação e nas sessões de oxigenioterapia. Todas as observações de peso, demonstração de dor e reoperação foram realizadas com a leitura pelo microchip sem identificação do grupo.

Nesse período, foram manipulados e estimulados pelo pesquisador simulando brincadeiras sociais normais entre ratos púberes.

Os animais foram habituados às caixas plásticas perfuradas utilizadas durante as sessões de oxigenioterapia hiperbárica no período de aclimatação. Essas mesmas caixas transparentes foram usadas para pesar os animais e para observação clínica.

3.6 CONTENÇÃO

A contenção foi mínima e necessária apenas para aplicação da pré-anestesia e transferências dos animais para caixas plásticas perfuradas usadas nas sessões de oxigenioterapia e para suas caixas originais do alojamento. Todos os procedimentos invasivos e que envolveram dor foram realizados sob anestesia geral.

3.7 DENOMINAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Quarenta ratas foram aleatoriamente distribuídas em 4 grupos, todos grupos passaram por ressecção de segmento de 1cm do cólon esquerdo, anastomose término-terminal e reoperação no quarto dia após a laparotomia.

Além desses procedimentos comuns a todos grupos, os grupos foram diferenciados como se segue e conforme quadro 1:

- o grupo controle foi submetido a esses procedimentos e a simulação de isquemia e de sessão de oxigenioterapia hiperbárica;
- o grupo OTH foi submetido às sessões de oxigenioterapia e a simulação de isquemia;
- o grupo Isq/OTH foi submetido às sessões de oxigenioterapia e à isquemia;
- o grupo Isq foi submetido apenas à indução de isquemia, não foi submetido à oxigenioterapia.

Quadro 1 - Denominação e descrição dos procedimentos dos grupos experimentais

Procedimento	Isquemia e OTH	Oxigenioterapia	Isquemia	Grupo controle
Denominação Grupo	G Isq/OTH	G OTH	G Isq	G Contr
Simulação de isquemia		X		X
Simulação de OTH			X	X
Isquemia	X		X	
OTH pré e pós-operatória	X	X		
Resseção de cólon e anastomose	X	X	X	X
Reoperação no 4º dia pós-operatório, coleta amostras	X	X	X	X

3.8 OXIGENIOTERAPIA HIPERBÁRICA

A câmara hiperbárica utilizada foi a Monoplace do Hospital das Forças Armadas (Modelo 2800, Sechrist Industries, INC). A higienização era realizada sempre ao final de cada dia de uso, semelhante a higienização terminal de bloco cirúrgico infectado com desinfetante a base de quaternário de amônio.



Figura 1 - Câmara Hiperbárica monoplace com animais em caixas plásticas com múltiplas perfurações.

Cada gaiola do alojamento abrigou quatro animais, um animal de cada grupo experimental. Cada grupo desse representou um bloco de animais que passaram pelos procedimentos nos mesmos dias. Para as sessões na câmara hiperbárica,

cada bloco foi separado em duas caixas plásticas de 230mm de altura, 210 mm de largura e 300 mm de comprimento com multiperfurações.

A caixa que continha um animal do G Isq/OTH e outro animal do G OTH era colocada dentro da câmara hiperbárica. A caixa que continha um animal do G Isq e um do G Contr permanecia fora da câmara. Não houve acomodação de animais de blocos diferentes nas mesmas caixas, as ratas foram acomodadas fazendo dupla com uma rata familiar de sua caixa original e, ao final da sessão, retornavam para a mesma caixa/bloco.

As caixas plásticas foram multiperfuradas de modo que não oferecessem superfície de corte para os animais, os furos foram dispostos nas laterais e na parte superior. O tamanho das perfurações nas laterais foi menor para impedir que os animais introduzissem as patas e se machucassem.

As sessões começaram dois dias anteriores ao procedimento, ocorreram à tarde do dia do procedimento e prosseguiram por três dias posteriores.

Todas as sessões foram com oxigênio a 100% na pressurização máxima de 2,4 ATA, ou seja, foram sessões de hiperóxia hiperbárica. Era iniciada a compressão, até a pressão interna da câmara chegar a 2,4 ATA, essa pressão era mantida por uma hora e então a descompressão era iniciada. Tanto compressão quanto descompressão foram realizadas na velocidade média de 0,07 ATA/min (+/-0,02). Os animais do G Contr e G Isq foram colocados ao lado externo da câmara hiperbárica sem pressurização. A temperatura da câmara foi mantida entre 22 e 25°C. A luz da sala foi diminuída para conforto das ratas. Todas as sessões foram no mesmo horário no período vespertino, com o intuito de minimizar os efeitos do ciclo circadiano (Apêndice H).

Os animais foram observados dentro câmara durante cada tratamento e foram monitorados para demonstração de alterações como convulsões ou qualquer sinal que pudesse sugerir barotrauma, tais como balançar persistente de cabeça e inquietação³¹.

Nos intervalos das sessões, as ratas foram mantidas nas caixas padronizadas do alojamento de animais de experimentação da Direção Técnica de Ensino e Pesquisa do Hospital das Forças Armadas.

Quadro 2 - Linha de tempo do experimento

	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4	Dia 5	Dia 6	Dia 7
Manhã			Operação				Reoperação, coleta de amostras histopatológico e congeladas a -80°C
	Sessão OTH	Sessão OTH	Sessão OTH	Sessão OTH	Sessão OTH	Sessão OTH	
Tarde				Avaliação clínica	Avaliação clínica	Avaliação clínica	

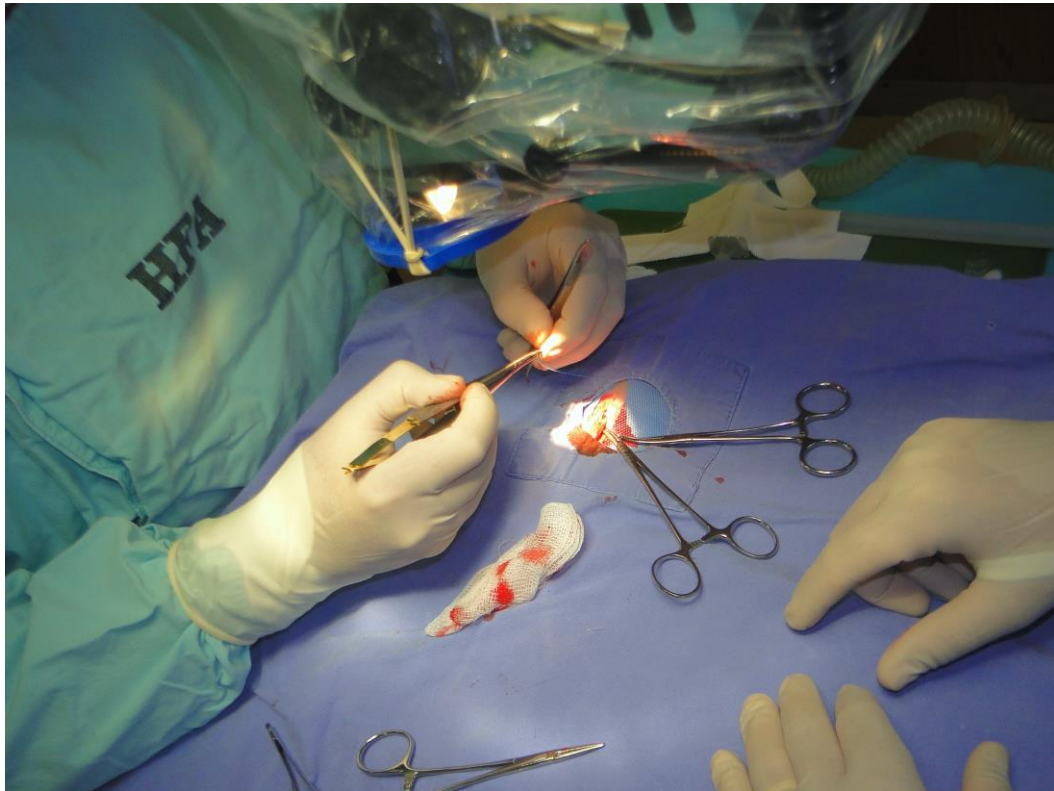


Figura 2 - Detalhe da operação com uso de microscópio cirúrgico



Figura 3 - Equipamentos utilizados, mesa cirúrgica, microscópio, aparelho de anestesia, eletrocoagulador, manta de aquecimento e cubas

3.9 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Todo material cirúrgico usado, instrumental, campos e compressas foram esterilizados em autoclave. Foi utilizado instrumental cirúrgico padrão, com exceção dos instrumentos cirúrgicos utilizados na síntese da anastomose com uso do microscópio cirúrgico. Os instrumentos de microcirurgia utilizados foram tesoura castroviejo curva com cabos cilíndricos, porta agulha castroviejo sem trava com cabos cilíndricos e pinça íris curva.

Foi usada manta térmica a 45°C durante a anestesia colocada logo abaixo do animal. Todos medicamentos e soluções foram pré-aquecidos em banho-maria a 38°C. A temperatura do animal foi monitorada e mantida entre 36° e 38° C.

A tricotomia foi realizada com equipamento de tosa veterinário com lâmina zero na parede abdominal anterior e assepsia do campo cirúrgico com digliconato de clorexidina a 2%.

Era realizada laparotomia mediana de 4 cm de extensão iniciada 2 cm cranial à genitália externa do animal.

A anastomose término-terminal foi realizada com o uso de microscópio cirúrgico. O uso do microscópio proporcionou uma técnica mais apurada para a anastomose do cólon. Todos outros procedimentos desde celiotomia, localização e exposição do cólon, ligaduras da vasa recta, fechamento de cavidade, aproximação até a sutura da pele foram realizados sem auxílio do microscópio.

Todas as ratas foram operadas sempre no período matutino pela mesma equipe, cujo cirurgião é o investigador principal.

Para a randomização, as operações foram realizadas em múltiplos de 4 com um animal de cada grupo por dia de operação e a sequência foi sorteada. Os animais foram levados para habituação à sala de operação uma hora antes do procedimento e foram pesados para individualização adequada dos anestésicos.

A anestesia geral foi induzida com midazolam 5mg/kg e cetamina 75mg/kg misturados na mesma seringa e aplicados via intraperitoneal. Imediatamente após a injeção intraperitoneal dos medicamentos da indução, as ratas foram recolocadas nas caixas originais em companhia das outras.

Após a constatação de imobilidade, foram retiradas da caixa, era aplicado 10 ml de solução preparada com solução salina fisiológica aquecida com glicose a 5% subcutâneo na região dorsal e gel oftálmico lubrificante nos olhos. As ratas foram posicionadas em supinação e membros torácicos e pélvicos foram fixos na mesa cirúrgica com esparadrapo. A máscara era posicionada e oxigênio era administrado por 5 minutos. Após esse tempo, era iniciada a aplicação de sevoflurano via máscara entre 0,25 e 0,5% para manutenção do animal em plano anestésico em sistema de não reinalação Mapleson E.

A laparotomia mediana foi iniciada por uma incisão na linha média do abdome de cerca de 4 cm, colocação cranial de gaze embebida em solução salina fisiológica para exposição de cólon distal, malaxação divergente quando o segmento intestinal a ser operado apresentou conteúdo fecal.

A isquemia induzida nos animais dos grupos G Isq e G Isq/OTH foi realizada tendo como primeiro passo a localização da placa de Peyer da reflexão peritoneal³², seguido da marcação da referência do procedimento dois centímetros cranial a ela. Segmento do cólon de três centímetros cranial ao ponto de referência era isolado e ramos veno-arteriais que drenavam ou irrigavam esse segmento colônico esquerdo eram eletrocoagulados. Os vasos mesentéricos da vasa recta foram eletrocoagulados com a pinça hemostática bipolar ajustada em 10 Watts. A placa

metálica foi colocada em contato com todo o dorso do animal. A seguir era ressecado um centímetro do terço médio desta porção desvascularizada conforme descrito por Adas et al em 2013⁶.



Figura 4 - Detalhe da operação com apoio do auxiliar, microscópico cirúrgico e instrumental de microcirurgia.

O trânsito colônico foi reconstruído por anastomose término-terminal em plano único, com pontos contínuos, englobando todas as camadas da parede intestinal com suturas com fio 6-0 de polipropileno com agulha cilíndrica de 1,3 cm (nome comercial Prolene^R, ETHICON).

Após término da anastomose, o cirurgião trocava as luvas.

A parede abdominal foi suturada em dois planos, primeiro incluindo peritônio, músculo e aponeurose da linha média, sutura contínua simples com fio 5-0 de polipropileno. O segundo plano incluiu tecido subcutâneo.

A incisão da pele foi suturada com fio 5-0 de polipropileno, sutura subcuticular contínua.

Para recuperação da anestesia, os animais foram mantidos por 30 minutos na caixa de indução anestésica sobre a manta térmica aquecida mantida a 38°C e com suprimento de oxigênio. A seguir, eram levados a suas gaiolas conforme descrito por Almeida (2006) e Durães (2013)^{33,34}.

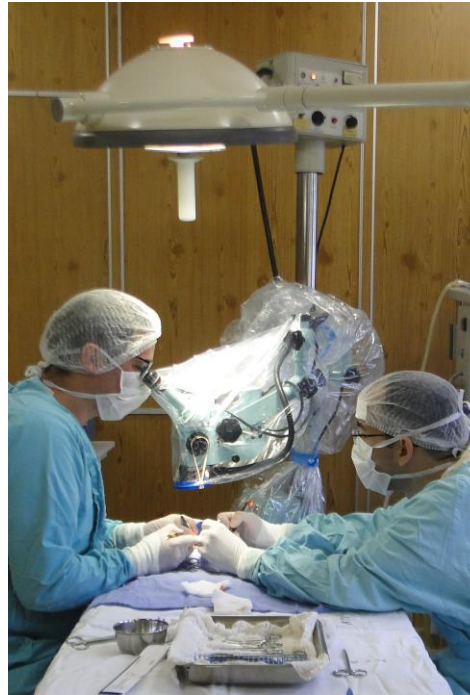


Figura 5 – Realização da anastomose término-terminal do cólon com uso do microscópio.

3.10 REOPERAÇÃO

A reoperação foi realizada no sétimo dia do experimento para avaliar a cavidade abdominal e o sítio de anastomose, coletar amostras da cicatriz abdominal e coletar segmento do cólon com a cicatriz anastomótica.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de tramadol 12,5mg/kg, midazolam 5mg/kg e cetamina 75mg/kg misturados na mesma seringa e aplicados no mesmo momento.

O animal era posicionado em decúbito dorsal, membros foram fixados com esparadrapo em uma prancha.

A cavidade abdominal foi aberta por meio da ressecção de um segmento da parede abdominal que continha a cicatriz da laparotomia anterior.

Após ampla exposição da cavidade, era realizado inventário com pesquisa de sinais de peritonite difusa, abscessos, deiscência bloqueada ou com vazamento

da anastomose, sinais de obstrução intestinal e aderências. A quantificação das aderências foi realizada pelo escore de Nair³⁵.

A seguir, a porção do cólon esquerdo contendo a anastomose era ressecada.

Imediatamente após a ressecção, ainda com animal anestesiado era realizada secção da veia cava para eutanásia.

O segmento intestinal ressecado era aberto pela borda antimesentérica e dividido longitudinalmente em três partes. O da direita era fixado em cartolina, ficando exposta a superfície mucosa, e conservado em formol tamponado a 10%, para posterior análise histopatológica. A porção central foi congelada a -80°C em solução fisiológica para medida da força de ruptura da anastomose. A porção esquerda também foi congelada a -80°C para posteriores estudos.

3.11 PARÂMETROS DE AVALIAÇÃO DA CICATRIZAÇÃO

Na avaliação da cicatrização foram usados parâmetros de evolução clínica, avaliação macroscópica da cavidade abdominal e da anastomose, estudo histopatológico e teste de resistência mecânica.

3.11.1 Avaliação macroscópica na reoperação

As aderências intra-abdominais foram avaliadas e quantificadas pelo escore de Nair³⁵:

0 – ausência de aderências;

1 – presença de uma única banda entre vísceras ou entre uma víscera e a parede abdominal;

2 – presença de duas bandas entre vísceras e ou entre vísceras e a parede abdominal;

3 – presença de mais de duas bandas entre vísceras ou entre vísceras e a parede abdominal, ou todo o intestino formando uma massa não aderida à parede abdominal;

4- presença de vísceras diretamente aderida à parede abdominal, não importando o número ou extensão das bandas.

3.11.2 Medida da força de ruptura

O método utilizado neste trabalho para avaliação mecânica da cicatrização foi o da força de ruptura.

A força da anastomose foi medida em newton (N) usando o aparato de teste VersaTest (Mecmesin VersaTest, United Kingdom) com dinamômetro de 2500 N (Mecmesin AFG 2500N, United Kingdom).

A força de ruptura é a maior medida da quantidade de força necessária para romper completamente a linha de sutura. O segmento do cólon sem aderências foi fixado por suas extremidades nas garras do dinamômetro com a linha de sutura equidistante dos pontos de fixação. A velocidade constante de 25 mm/min, cada garra deslocava-se no mesmo eixo em sentidos opostos até a ruptura da linha de sutura. O maior valor era registrado pelo aparelho e era o valor considerado como força de ruptura.

3.11.3 Estudo Histopatológico

Os segmentos do intestino destinado ao histopatológico eram fixados em formalina a 10% tamponada durante 24 horas e transferidos para formalina a 10% até o momento em que eram embebidos em parafina. Seções transversais de 3 mm de espessura do tecido preparado foram corados com hematoxilina e eosina, e as avaliações histológicas foram realizadas por microscopia de luz por patologista experiente que desconhecia a identidade do grupo de origem das amostras.

A patologista avaliou de maneira semiquantitativa em zero, um, dois ou três.

Os indicadores estudados foram colágeno, fibroblastos, infiltrado mononuclear, infiltrado polimorfonuclear, hemorragia e congestão, neovascularização e edema. Foram avaliados como zero (ausente), um (leve), dois (moderado) e três (acentuado). O indicador reepitelização foi avaliado em zero (ausente), um (parcial) e dois (total). A partir dessa avaliação, médias e demais parâmetros estatísticos foram calculados para comparação entre grupos.

Os indicadores ulceração, necrose isquêmica, microabscesso, colônias bacterianas, corpo estranho, crosta fibrinoleucocitária e separação dos bordos da ferida foram avaliados em ausente ou presente e foram tratados como variáveis categóricas.

3.12 EVOLUÇÃO CLÍNICA E CONTROLE PONDERAL

Acompanhou-se a evolução clínica com observação antes da pesagem. Cada rata era colocada individualmente em caixa plástica perfurada transparente e então avaliada sempre ao final da tarde entre as 18 e 19 horas por apenas um único observador. Logo após a observação e registro dos parâmetros clínicos, eram pesadas em balança eletrônica.

Foram avaliados padrões clínicos pelos seguintes aspectos: contração periorbital, abaulamento de focinho e bochechas, posicionamento de orelhas e de vibrissas, redução de atividade, afundamento de flancos, arqueamento de dorso, piloereção e abdome inchado³⁶⁻³⁹. Os critérios foram avaliados semiquantitativamente como zero (imperceptível), um (perceptível) e dois (acentuado).

Cromodacriorreia é a pigmentação vermelha a volta dos olhos. A cor é devida a pigmentos de porfirina secretados pelas glândulas de Harder. Acredita-se que essa secreção esteja relacionada com mecanismos muscarínicos e é relevante indicador de estresse.

O abaulamento do focinho é o aumento de volume arredondado na parte superior do focinho evidenciado pela aparência mais convexa a partir de seu alinhamento normal da bochecha. Rato demonstra dor pelo achatamento das bochechas e do focinho.

Ratos demonstram dor ou desconforto quando posicionam suas orelhas mais caudais de sua posição básica.

Foi considerado como demonstração de dor e ou desconforto qualquer mudança da posição normal das vibrissas, sejam elas deslocadas para trás (caudal), para frente (cranial) ou mais proximal à face.

Um escore global foi definido como a soma dos pontos para cada animal para cada dia de observação e foi usado exclusivamente para definição de ponto final humanitário.

Foram estabelecidos dois critérios para ponto final humanitário: perda ponderal e escore global de dor.

No critério ponderal, foi definido como ponto final humanitário a perda ponderal individual maior que 20% do que o peso inicial a qualquer momento do experimento⁴⁰.

O critério para definição de ponto final humanitário por demonstração de dor, foi a soma de todos os itens, ou seja, o escore global, fosse igual ou superior a 6.

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para testar a normalidade da distribuição foi utilizado o teste de Saphiro-wilk.

As variáveis categóricas foram resumidas como números absolutos e percentagens e comparadas usando teste exato de Fisher bicaudal.

Variáveis contínuas paramétricas foram expressas em média(+/- desvio padrão).

Variáveis contínuas não paramétricas foram expressas em mediana (primeiro quartil-terceiro quartil). Quando pareadas foram comparadas com Teste de Friedman. Quando não pareadas foram comparadas com o teste de Kruskal-Wallis⁴¹⁻⁴⁶.

A correlação entre todos os parâmetros histopatológicos sem distinção entre grupos experimentais foram feitos aos pares pela correlação Tau B de Kendall pela amostra ser pequena e não paramétrica e está expressa em Coeficiente de correlação tau de Kendall (τ_b) e valor de p bicaudal. As correlações foram consideradas como insignificante se $r < 0,30$, moderada se $0,31 < r \leq 0,70$ e forte se $r > 0,71$.

Todas probabilidades menores que 5% ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significativas.

Os resultados foram analisados usando o programa SPSS^{MR} (Special Package for Social Sciences) e programa de planilha eletrônica Excel da Microsoft^{MR}

4 RESULTADOS

4.1 EVOLUÇÃO CLÍNICA

Não houve necessidade de retirar qualquer animal do experimento pelos critérios de ponto final humanitário. O único animal que morreu no período pós-operatório, identificação 322, demonstrou apenas um sinal monitorado, a cromodaciorréia classificada como um (visível) (Apêndices N,O,P).

Crítérios monitorados que não foram demonstrados por nenhum animal em nenhum dos dias de observação foram: contração periorbital, abaulamento de focinho e bochecha, alteração de posicionamento de vibrissas, dorso arqueado e abdome inchado. Análise estatística foi desnecessária porque as avaliações de todos animais em todos os dias para esses critérios foram zero (Apêndices N,O,P).

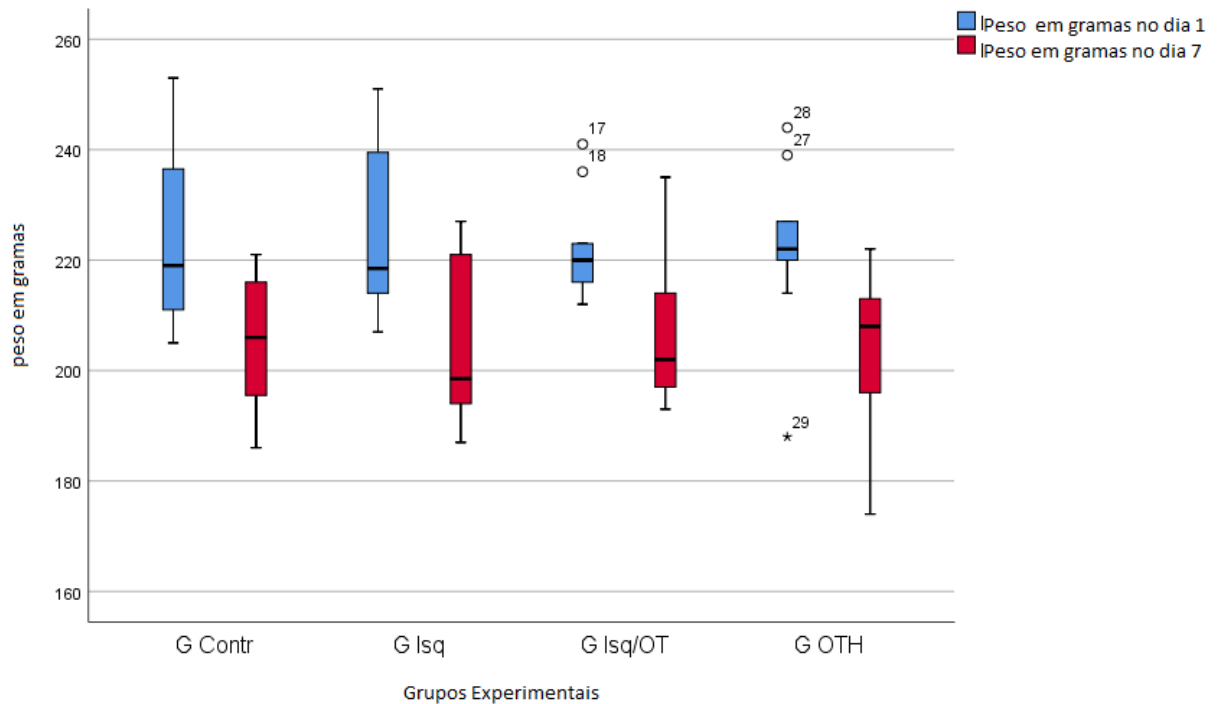
4.1.1 Controle ponderal

Todos animais perderam peso entre o primeiro e o sétimo dia do experimento, estatisticamente significativa no teste de Friedman pareado $p=0,02$. Pelo teste de Kruskal-Wallis, para comparação entre grupos não houve diferença estatisticamente significativa da perda ponderal relativa entre os grupos ($p=0,921$), nem do peso no primeiro dia do experimento ($p=0,619$) nem do peso no sétimo dia ($p=0,990$).

Medianas (primeiro quartil-terceiro quartil) no primeiro dia do experimento G Contr para peso como se segue 219g (209-237,25); G Isq 218,50g (212,50-243,75); G Isq/OTH 220g (215,75-226,25); G OTH 222g (218,50-230). No sétimo dia do experimento as medianas foram: G Contr 206 (193,25-216); G Isq 198,50g (196,50-214); G Isq/OTH 202g (196,50-214); G OTH 208g (193,25-213)(Apêndice M).

As médias e desvios padrão das perdas ponderais relativas foram de: -8,22% (+/-2,73) no G Contr; -8,90% (+/-2,83) no G Isq; -7,69% (+/-2,22) no G Isq/OTH; e no G OTH foi -8,53% (+/-3,19). A maior perda ponderal registrada foi de -13,82%. Nenhum animal alcançou o ponto final humanitário estabelecido em perda ponderal acima de 20% (Apêndice L).

Gráfico 1 – Pesos em gramas por grupo e por dia, no primeiro dia e no sétimo dia do experimento

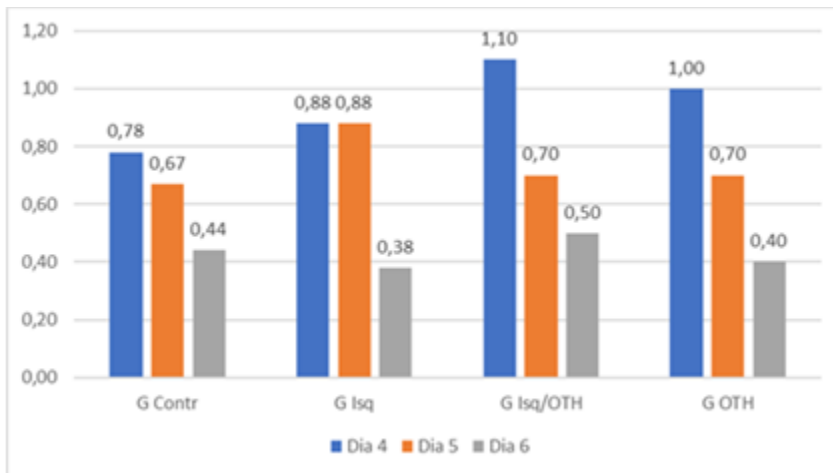


4.1.2 Cromodacrioreia

É a secreção vermelha ao redor dos olhos e algumas vezes percebida no focinho. A glândula lacrimal acessória de Harder secreta material rico em lipídios e em porfirinas que lubrificam olhos e pálpebras. Quando pode ser percebida, significa aumento de produção da glândula ou diminuição da auto-higienização do rato, ambas situações estão relacionadas a estresse agudo causado por dor, por doença ou por contenção.

Houve animais com cromodacrioreia em todos os grupos, apenas um animal do G Isq/OTH foi avaliado como cromodacrioreia 2 (evidente), todos outros ou não manifestaram ou foram avaliados como 1 (perceptível). A manifestação de cromodacrioreia decresceu em todos os grupos como pode ser visto no gráfico 2. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos $p=0,159$ no quarto dia do experimento, $p=0,778$ no quinto dia e $p=0,954$ no sexto dia (Kruskal-Wallis)(Apêndices Q,S, e T).

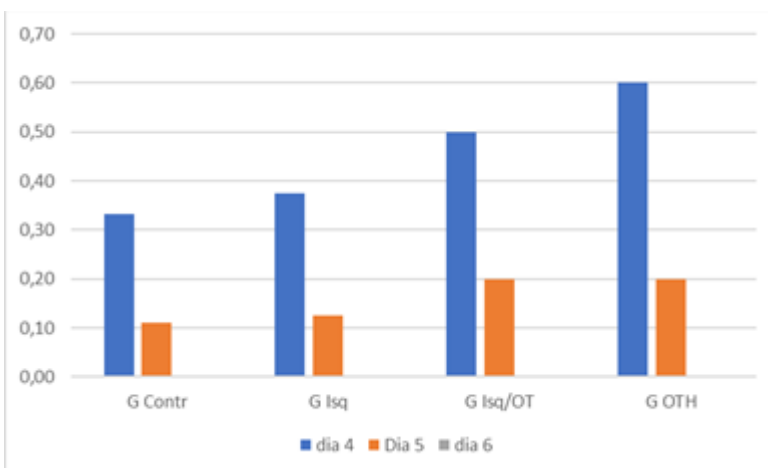
Gráfico 2 - Escore médio por grupo do critério cromodacrioreia



4.1.3 Avaliação da redução de atividade por grupo

A redução da atividade foi mais evidente no quarto dia, foi mais discreta no quinto dia e não foi registrada no sexto dia como pode ser visto no gráfico 3. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, $p=0,441$ no quarto dia, $p=0,828$ no quinto dia e $p=1$ no sexto dia no teste Kruskal-Wallis (Apêndices N, O e P).

Gráfico 3 - Escore médio por grupo e por dia após cirurgia no critério redução de atividade

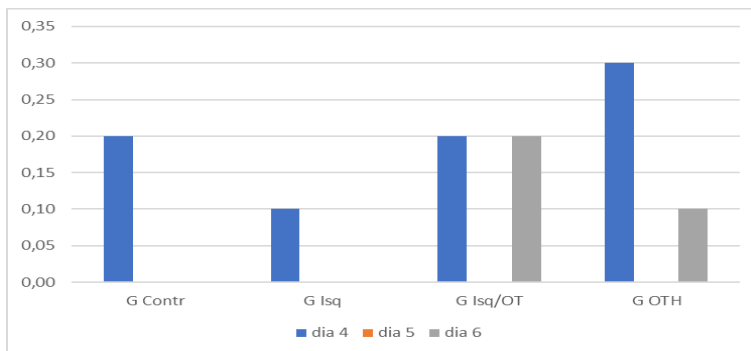


4.1.4 Afundamento do Flanco

Pelo menos um animal de cada grupo apresentou afundamento de flanco, todos animais que apresentaram afundamento de flanco foram classificados como 1 (perceptível). Nenhum animal apresentou afundamento de flanco avaliado em 2 (evidente).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos $p=0,749$ no quarto dia, 1 no quinto dia e 0,276 no sexto dia pelo teste de Kruskal-Wallis.

Gráfico 4 - Escore médio por grupo e por dia após operação no critério afundamento de flancos.



4.2 ÓBITOS

Houve 4 óbitos, três durante anestesia e um na véspera da reoperação. Os animais mortos não foram substituídos.

As duas primeiras ratas do experimento a serem anestesiadas, animal de identificação 297 do Grupo Isquemia e a 298 do Grupo Controle, morreram sob ação da indução de fentanil e midazolam antes mesmo do início da cirurgia.

Foi tomada a decisão de substituir fentanil por cetamina 75mg/kg no protocolo anestésico. A indução da anestesia a partir do terceiro animal e para todos animais restantes do experimento foi modificada para midazolam 5mg/kg e cetamina 75mg/kg misturados na mesma seringa e aplicados no mesmo momento via intraperitoneal como indução.

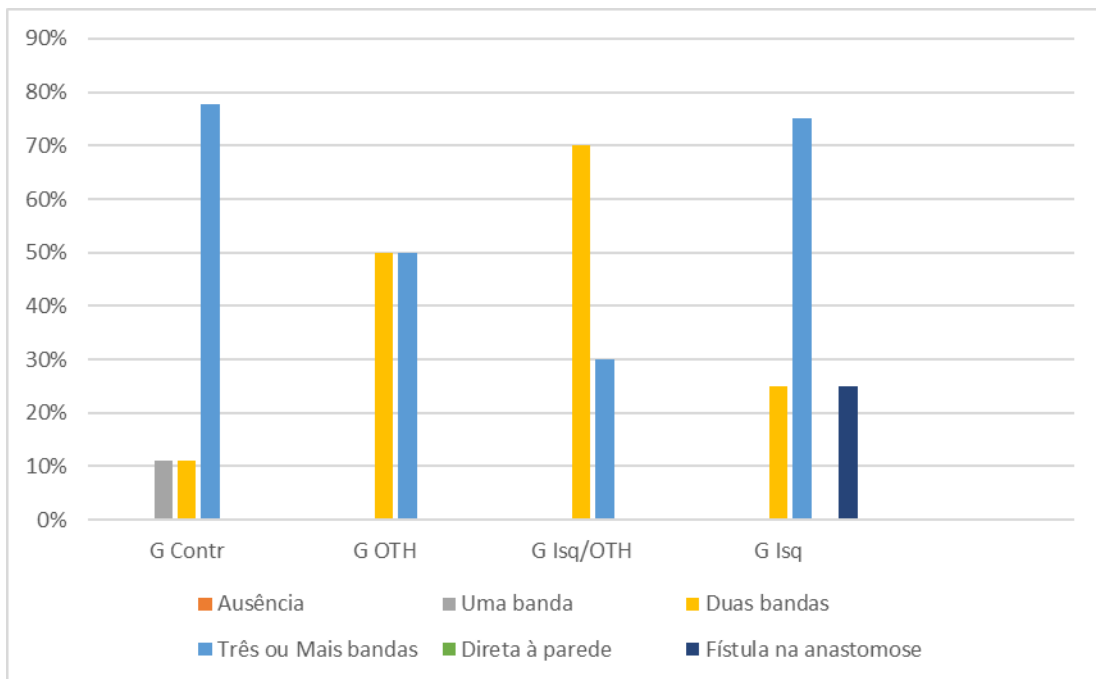
Sevoflurano era aplicado via máscara entre 0,25 e 0,5% para manutenção do animal em plano anestésico. A combinação midazolam/cetamina/sevoflurano foi adequada em todos animais, exceto no animal 305 do Grupo Isquemia, que aumentou frequência respiratória durante a cirurgia e morreu com o aumento da concentração de sevoflurano de 0,5% para 1%.

O animal 322 do grupo controle morreu na véspera de sua reoperação. Foram realizados os procedimentos de reoperação padronizados e descritos e foram coletados materiais. Na necropsia, nenhuma alteração destoante dos outros animais foi encontrada, não havia sinais de fístula nem de peritonite. No monitoramento de parâmetros clínicos após a operação, a única alteração percebida foi cromodacriorreia classificada como visível, em uma escala de imperceptível, visível e evidente.

4.3 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA NA NECRÓPSIA

A cavidade abdominal foi explorada no dia da eutanásia à procura de alterações como peritonite, vazamentos de conteúdo intestinal e abscessos. As aderências foram avaliadas pelo escore de Nair. Todos animais apresentaram pelo menos uma aderência e a frequência maior foi de duas e três aderências em todos os grupos (Apêndice V). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, $p=0,202$ (Kruskall-Wallis).

Gráfico 5 – Frequência relativa de animais por grupo, por quantidade de fístula e por quantidade de aderências pelo escore de Nair



A avaliação da presença de fístula na anastomose foi realizada no momento da necropsia pela observação macroscópica ao redor da anastomose, definindo-se como fístula a presença de orifício com vazamento de qualquer conteúdo ou sem vazamento por estar bloqueado por abscesso perianastomótico. Os únicos animais que apresentaram fístula foram o 325 e o 317, ambos do grupo isquemia. Para o teste exato de Fisher não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, $p=0,183$.

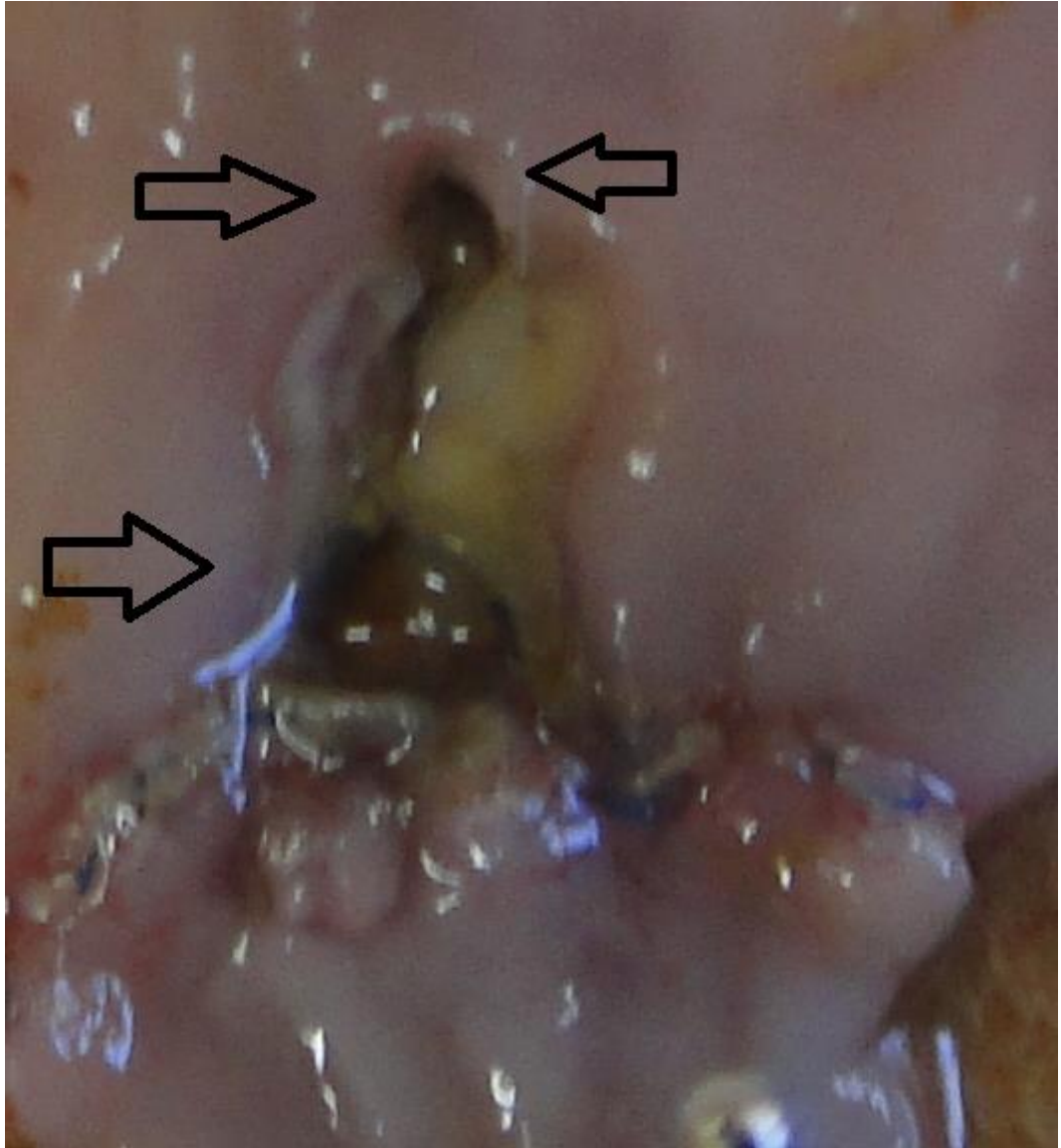


Figura 5 - Fístula no animal 317, comunicação entre luz do cólon e cavidade destacadas com as setas

4.4 RESULTADOS COMBINADOS DE DESFECHOS CLÍNICOS RELEVANTES

Combinando-se os desfechos clínicos mais relevantes de óbito e de fístula e comparando os resultados dos animais que passaram pelas sessões de oxigenioterapia hiperbárica, animais do G OTH e G Isq OTH, com os que não passaram, ou seja, os animais dos G Contr e G Isq, houve diferença estatisticamente significativa.

Foram retirados dessa comparação os animais 297 do G Isq e 298 do G Contr, porque foram os dois primeiros animais nos quais fentanil foi utilizado. Todos os animais restantes do experimento foram anestesiados exatamente com o mesmo protocolo. Dois deles morreram. Um deles morreu na véspera da reoperação e outro durante anestesia. Dos animais que não passaram pelas sessões de hiperbárica, dos grupos G Isq e G Contr, 22,22% (4/18) ou tiveram fístula ou morreram. Nenhum animal dos grupos que passaram pelas sessões de hiperbárica dos grupos G Isq/OTH e G OTH (0/20) tiveram qualquer desses desfechos. Essa diferença é estatisticamente significativa para $p=0,036$ para teste exato de Fisher.

4.5 FORÇA DE RUPTURA

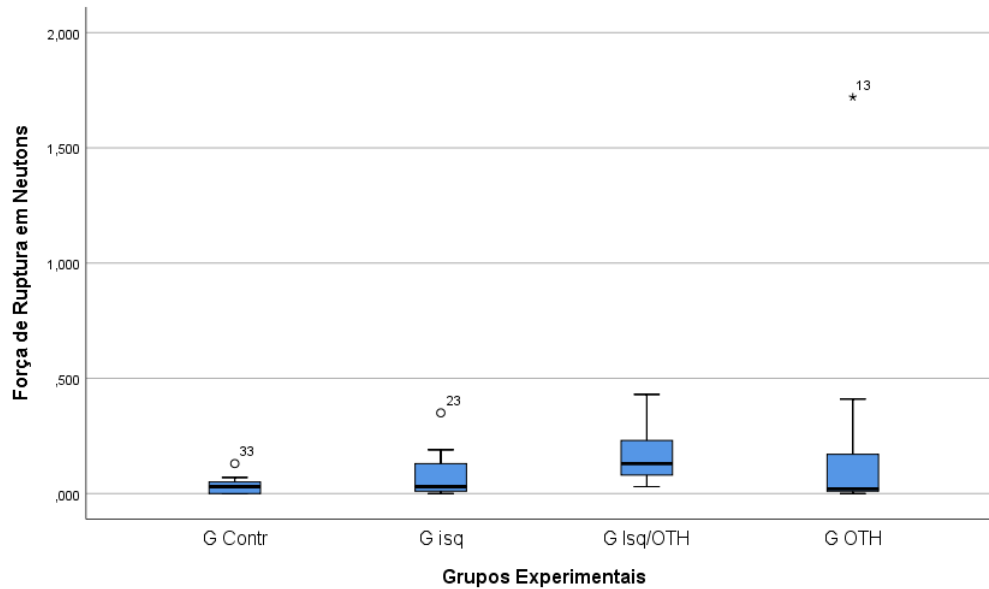
Os resultados discriminados por animal encontram-se no apêndice U e os resultados estatísticos podem ser vistos na Tabela 3 e no Gráfico 6.

Tabela 3 - Valores estatísticos da força máxima de ruptura em newtons

Parâmetros Estatísticos	Grupo Experimental				
	G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH	
Valor de p (Saphiro-Wilk)	0,118	0,010	0,107	0,000	
Mediana	0,03	0,03	0,13	0,02	
Primeiro quartil-terceiro quartil	0,00-0,06	0,01-0,015	0,07-0,027	0,01-0,023	
Média	0,04	0,09	0,17	0,24	
Desvio Padrão	0,04	0,11	0,14	0,54	
Erro Padrão	0,01	0,04	0,05	0,17	
95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	0,01	0,01	0,05	-0,14
	Limite superior	0,07	0,17	0,28	0,62
5% da média aparada	0,04	0,08	0,16	0,17	
Variância	0,00	0,01	0,02	0,29	
Mínimo	0,00	0,00	0,03	0,00	
Máximo	0,13	0,35	0,43	1,72	
Intervalo	0,13	0,35	0,40	1,72	

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as distribuições entre os grupos $p=0,115$ (Kruskall-Wallis, 3 Graus de Liberdade).

Gráfico 6 - Valores de força de ruptura do cólon expressos em newtons por grupo experimental



4.6 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

A patologista avaliou semiquantitativamente os seguintes critérios: colágeno, fibroblastos, infiltrados mononuclear e polimorfonuclear, neovascularização e edema em ausente(0), leve (1), moderado (2) e acentuado (3) (Tabela 4 e Apêndice W).

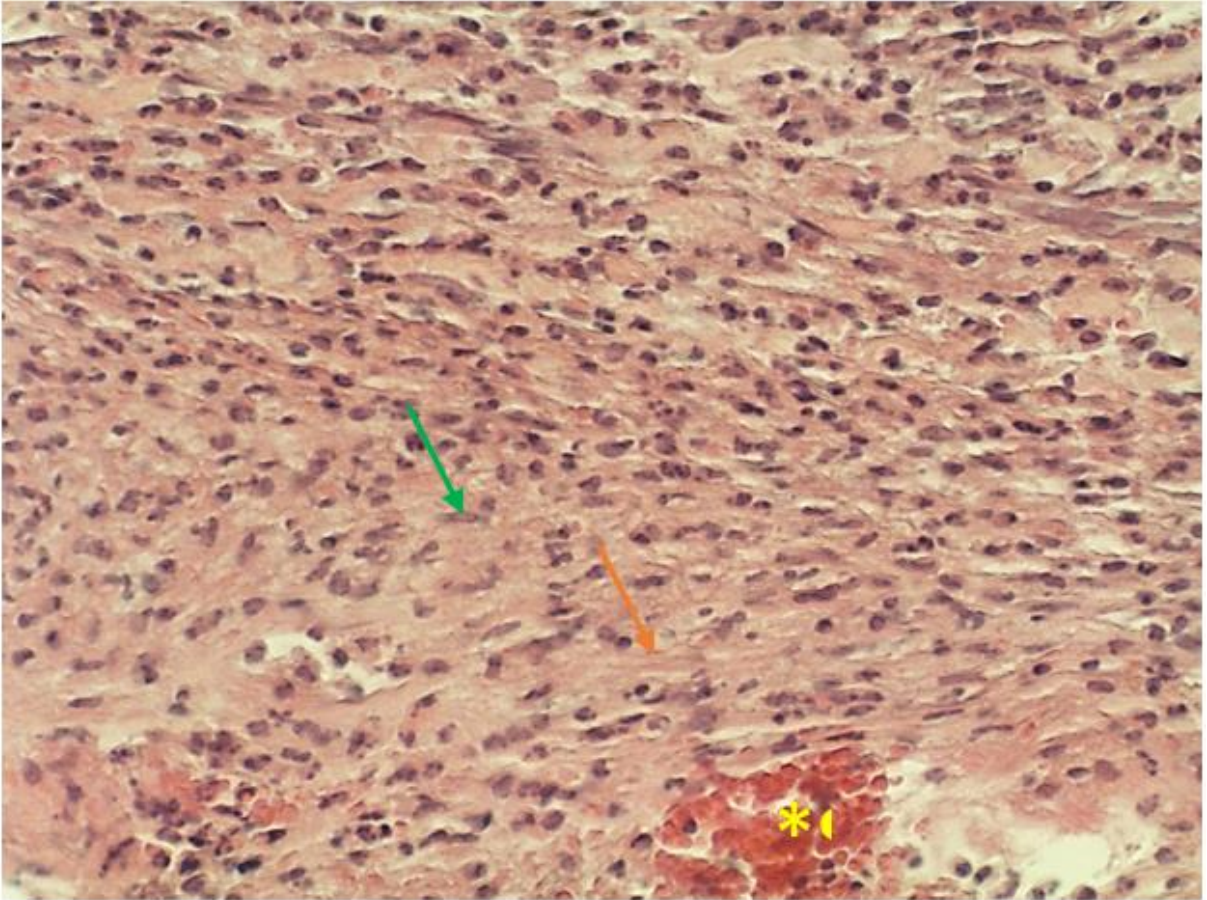


Figura 6 - Microscopia da cicatriz. Colágeno (seta laranja), fibroblasto (seta verde) e neovascularização (asterisco amarelo). (HE, 200X)

Tabela 4 – Frequência relativa de resultados por grupos e por parâmetros avaliados em ausente, leve, moderado e acentuado, frequências que foram zero em todos os grupos não foram listados na tabela.

Parâmetro	Grupos Experimentais			
Colágeno				
	G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH
ausente	11,11%	14,29%	37,50%	0,00%
leve	77,78%	85,71%	62,50%	88,89%
moderado	11,11%	0,00%	0,00%	11,11%
fibroblastos				
	G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH
ausente	11,11%	0,00%	12,50%	0,00%
leve	11,11%	14,29%	25,00%	0,00%
moderado	77,78%	85,71%	62,50%	100,00%
Infiltração de mononucleados				
	G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH
leve	22,22%	28,57%	12,50%	22,22%
moderado	77,78%	71,43%	87,50%	77,78%
Infiltração de polimorfonucleados				
	G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH
ausente	11,11%	0,00%	0,00%	0,00%
leve	11,11%	14,29%	0,00%	11,11%
moderado	33,33%	14,29%	37,50%	11,11%
intensa	44,44%	71,43%	62,50%	77,78%
Hemorragia e congestão				
	G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH
ausente	44,44%	28,57%	50,00%	44,44%
leve	33,33%	71,43%	50,00%	55,56%
moderado	22,22%	0,00%	0,00%	0,00%
Neovascularização				
	G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH
Leve	0,00%	0,00%	37,50%	11,11%
moderado	100,00%	100,00%	62,50%	88,89%
Edema				
	G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH
intensa	0,00%	0,00%	12,50%	0,00%
Leve	66,67%	85,71%	75,00%	88,89%
moderado	33,33%	14,29%	12,50%	11,11%

A partir dos valores da avaliação, médias foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis para amostras independentes por comparações múltiplas pareadas. Os resultados discriminados por animal encontram-se no apêndice W e os resultados estatísticos podem ser vistos na Tabela 5 e no apêndice X. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Tabela 5 Comparação entre os grupos critérios histopatológicos avaliados como ausente(0), leve (1), moderado (2) e acentuado (3).

Critério	Valor de p (Kruskal-Wallis)
Colágeno	0,845
Fibroblastos	0,845
Infiltrado mononuclear	1
Infiltrado polimorfonuclear	0,491
Neovascularização	1
Edema	1
Hemorragia e Congestão	0,838

A correlação entre todos os parâmetros histopatológicos sem distinção entre grupos experimentais foram feitos pela correlação Tau B de Kendall e estão expressos em Coeficiente de correlação tau de Kendall (τ_b) e valor de p (Apêndice Y).

Na análise de correlação entre os parâmetros a correlação foi forte e positiva entre:

- a) fibroblastos e colágeno ($Tb=0,769$, $p=0,000$); e
- b) microabscessos e infiltrado de polimorfonucleados ($Tb=0,731$, $p=0,000$).

A correlação foi moderada e positiva entre:

- a) neovascularização e colágeno ($Tb=0,543$, $p=0,002$);
- b) neovascularização e fibroblastos ($Tb=0,534$, $p=0,002$);
- c) reepitelização e colágeno ($Tb=0,498$, $p=0,003$);
- d) reepitelização e fibroblastos ($Tb=0,450$, $p=0,008$);
- e) microabscesso e ulceração ($Tb=0,352$, $p=0,03$);
- f) crosta fibrinoleucocitária e ulceração ($Tb=0,528$, $p=0,003$);
- g) crosta fibrinoleucocitária e separação das bordas da ferida da operação ($Tb=0,383$, $p=0,030$);
- h) separação dos bordos da ferida cirúrgica e crosta ($Tb=0,383$, $p=0,030$).

A correlação foi moderada e negativa entre:

- a) crosta fibrinoleucocitária e reepitelização ($Tb = -0,481$, $p = 0,005$);
- b) crosta fibrinoleucocitária e ulceração ($Tb = -0,528$, $p = 0,003$);
- c) separação das bordas da ferida da operação e fibroblastos ($Tb = -0,446$, $p = 0,010$).

Com relação a ausência ou presença dos achados histopatológicos, foram classificados ulceração, crosta fibrinoleucocitária, necrose isquêmica, microabscesso, colônias, corpo estranho e separação das bordas da ferida da operação (Tabela 6). Após contagem de resultados por grupo experimental foram comparadas a cada dois grupos pelo teste exato de Fisher. Os resultados discriminados por animal encontram-se no Apêndice Z.

Tabela 6 - Histopatologia por grupo e por achado em porcentagem de critérios avaliados em ausente ou presente.

Grupos	G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH
Ulceração				
Ausente	22%	0%	0%	11%
Presente	78%	100%	100%	89%
Crosta fibrinoleucocitária				
Ausente	33%	0%	0%	11%
Presente	67%	100%	100%	89%
Necrose isquêmica				
Ausente	89%	100%	75%	78%
Presente	11%	0%	25%	22%
Microabscesso				
Ausente	33%	29%	12%	11%
Presente	67%	71%	88%	89%
Colônias				
Ausente	44%	71%	38%	56%
Presente	56%	29%	62%	44%
Corpo Estranho				
Ausente	89%	100%	75%	100%
Presente	11%	0%	25%	0%
Separação das Bordas da Ferida da operação				
Ausente	56%	43%	38%	56%
Presente	44%	57%	62%	44%

4.6.1 Ulceração

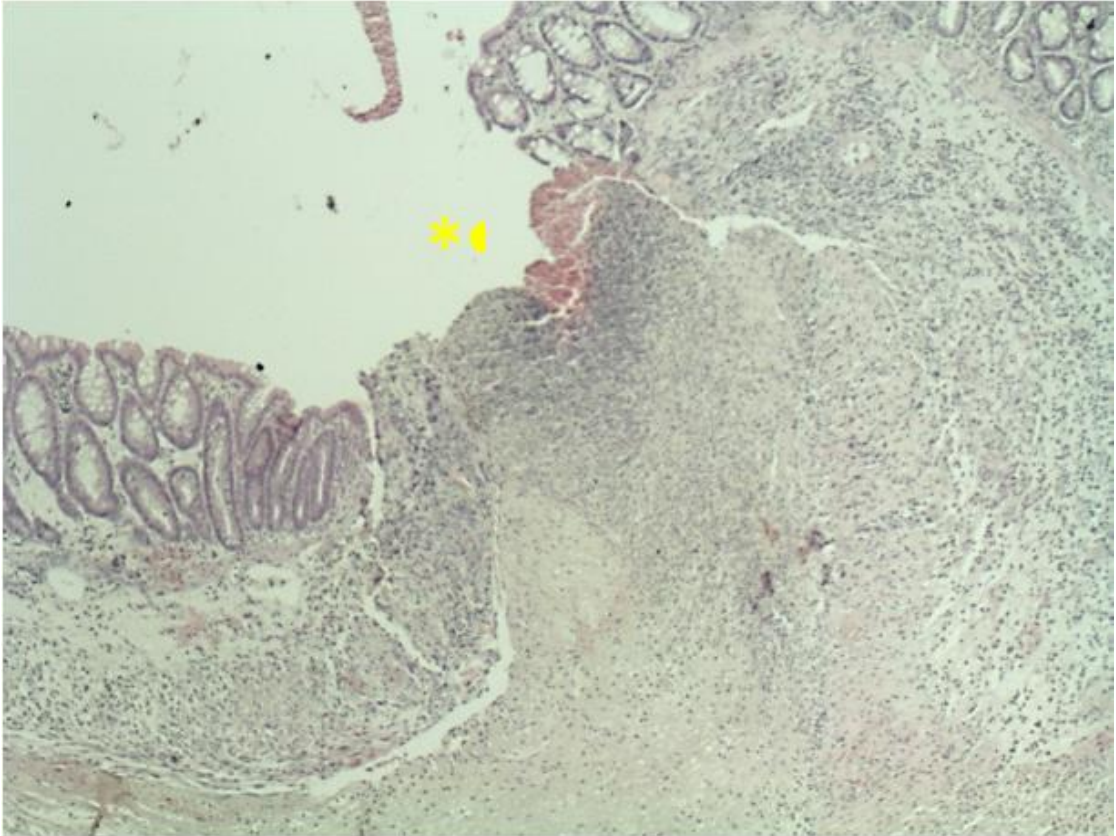
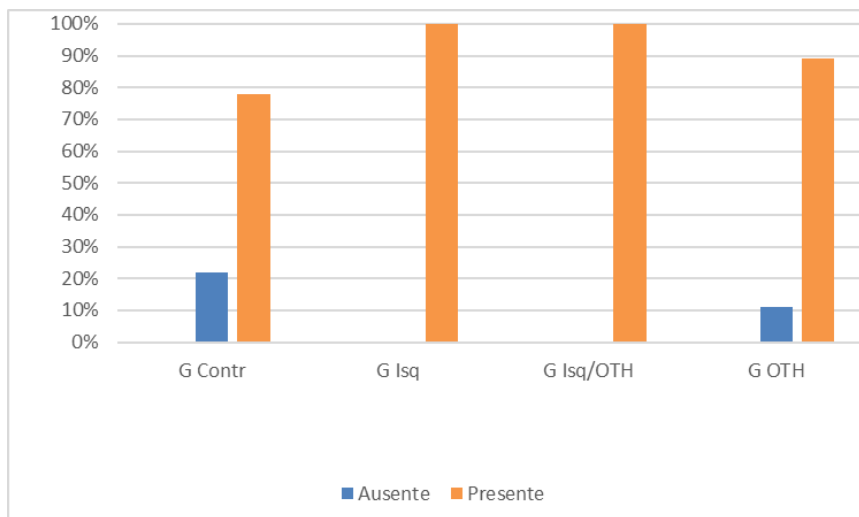


Figura 7 - Microscopia da cicatriz. Ulceração (asterisco amarelo). (HE, 40 X).

Todos animais dos grupos G Isq e G Isq/OTH apresentaram ulceração. Não houve diferença estatística entre os grupos G Contr e G OTH ($p=1$, teste exato de Fisher).

Gráfico 7 - Frequência relativa entre os grupos no item ulceração da análise histopatológica.



4.6.2 Crosta fibrinoleucocitária

Todos resultados de animais dos grupos G Isq e G Isq/OTH apresentaram crosta fibrinoleucocitária. Apesar do Gr Contr ter apresentado frequência relativa menor de crosta fibrinoleucocitária do que o G OTH, 67% contra 89%, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos $p=0,576$ (Teste Exato de Fisher).

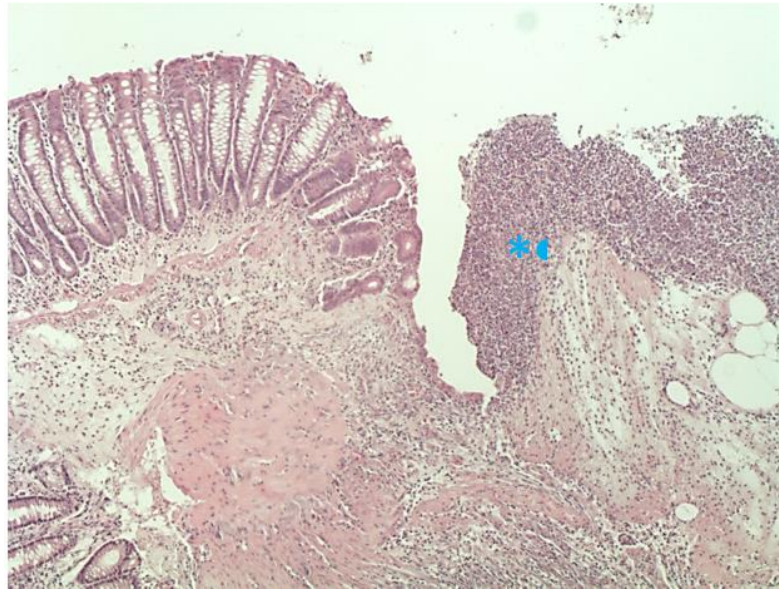
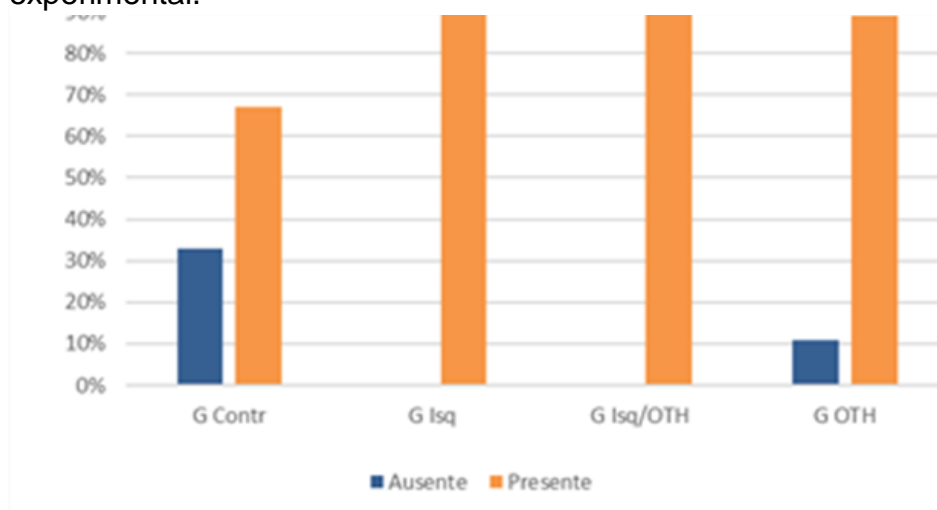


Figura 8 - Microscopia da cicatriz. Crosta fibrinoleucocitária (asterisco azul) na úlcera. (HE, 40 X).

Gráfico 8 – Frequência relativa de crosta fibrinoleucocitária por grupo experimental.



4.6.3 Necrose Isquêmica

Os grupos G Contr, G Isq/OTH e G OTH apresentaram resultados bastante próximos que podem ser vistos no gráfico 9 e confirmados pela ausência de diferença estatisticamente significativa na comparação entre os grupos G Isq e G Isq/OTH $p=0,467$; e entre os grupos G Contr e G OTH ($p=1$, teste exato de Fisher).

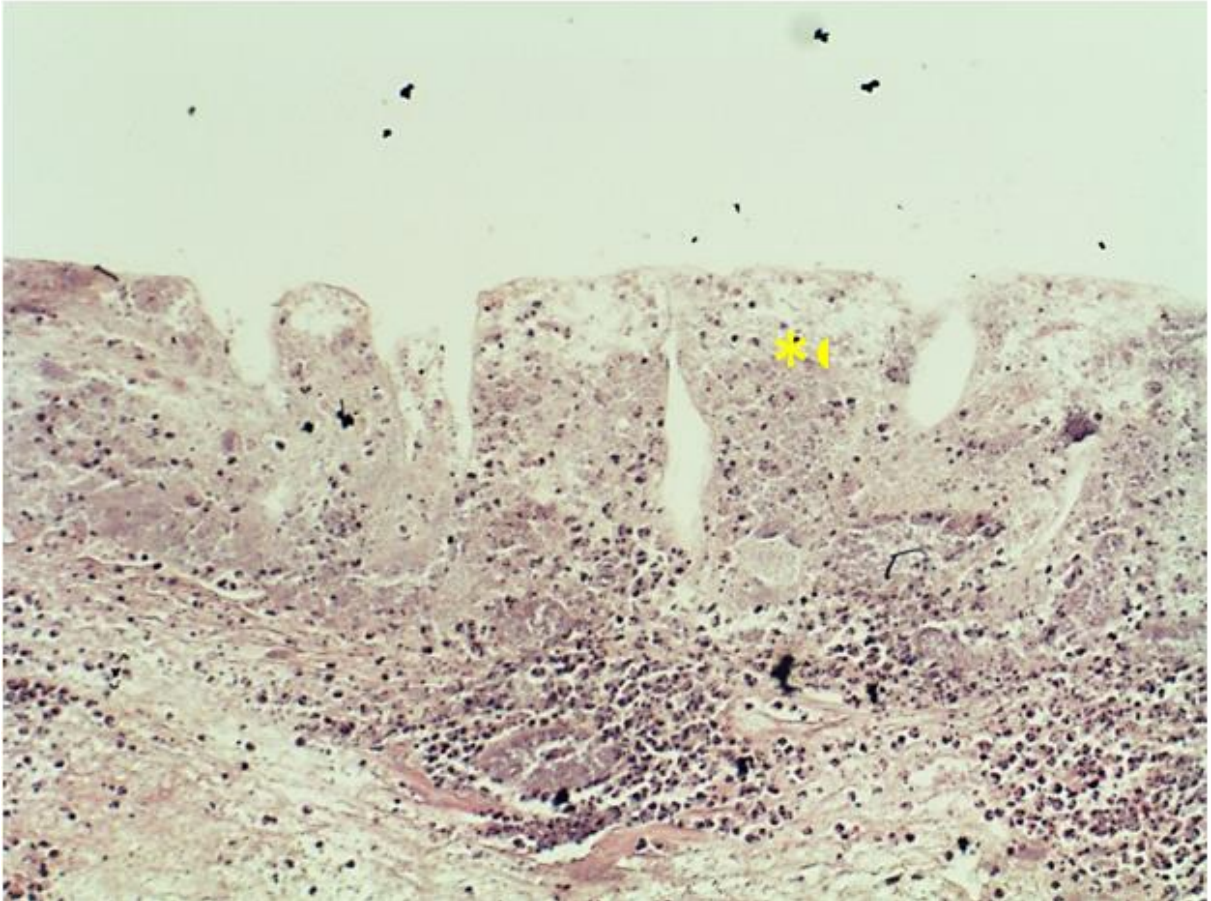
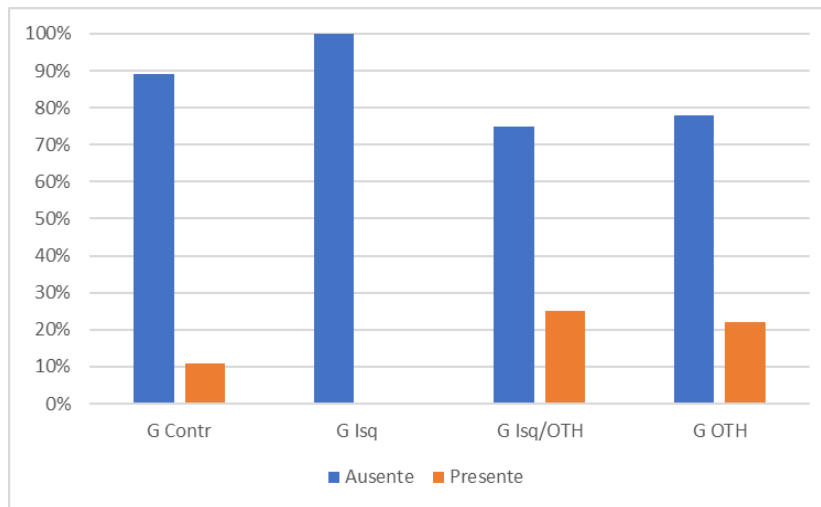


Figura 9 - Microscopia da cicatriz. Necrose isquêmica da mucosa (asterisco amarelo). (HE, 100X).

Gráfico 9 - Frequência relativa necrose isquêmica por grupo experimental



4.6.4 Microabscesso

Microabscesso foi constatado em todos os grupos e não houve diferença estatística na comparação (G Isq x G Isq/OTH) $p=0,569$ entre os grupos G Contr e G OTH ($p=0,576$, teste exato de Fisher).

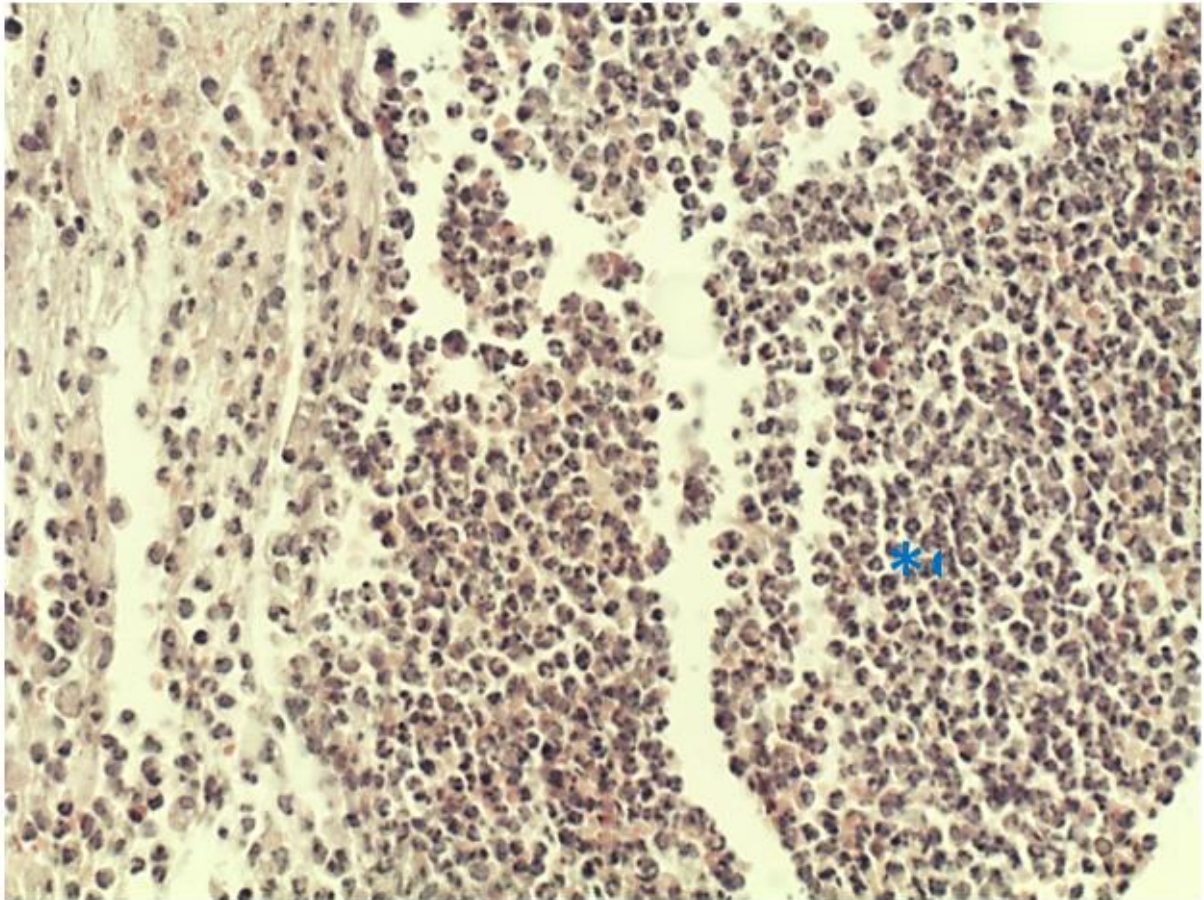
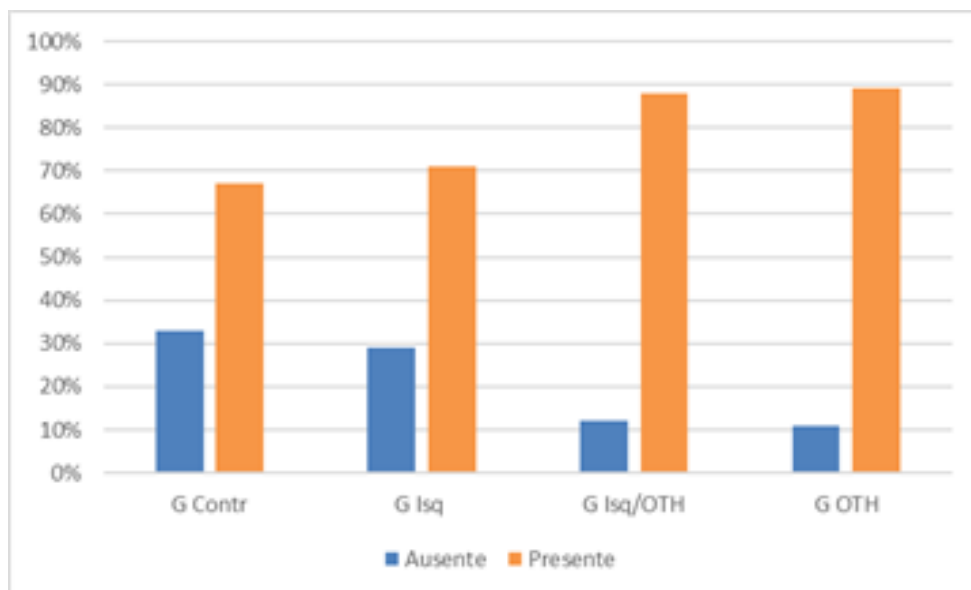


Figura 10 - Microscopia da cicatriz. Microabscesso neutrofílico (asterisco azul). (HE, 200 X).

Gráfico 10 – Frequência relativa de microabscesso por grupo experimental



4.6.5 Colônias bacterianas

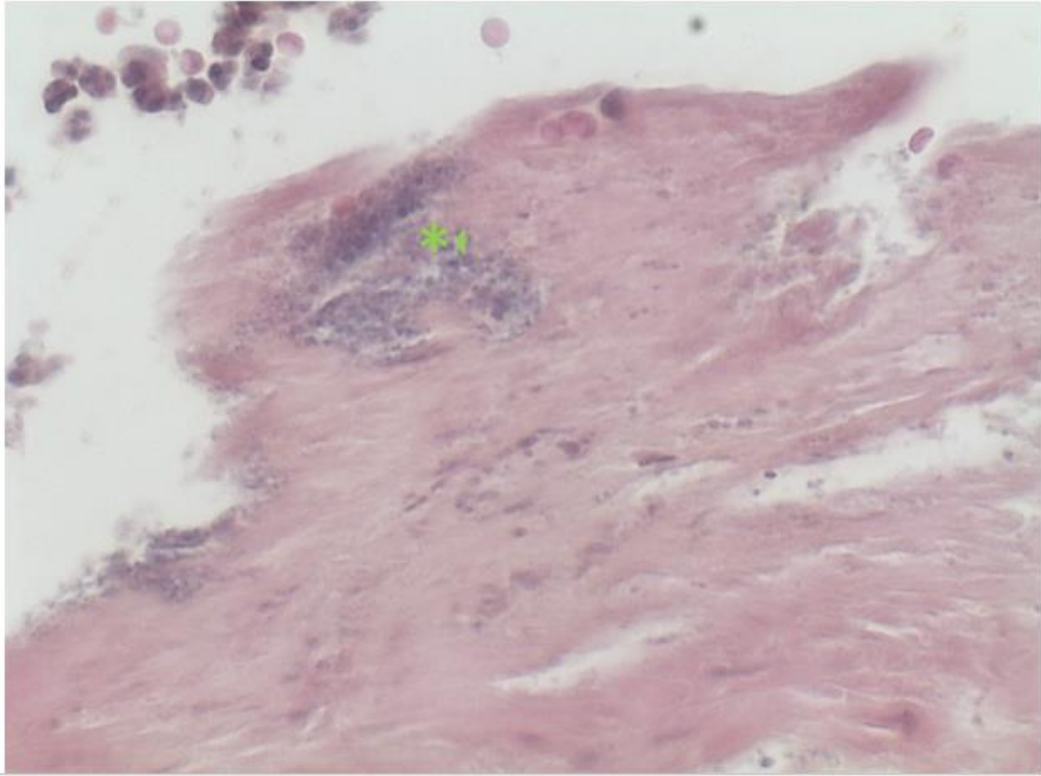
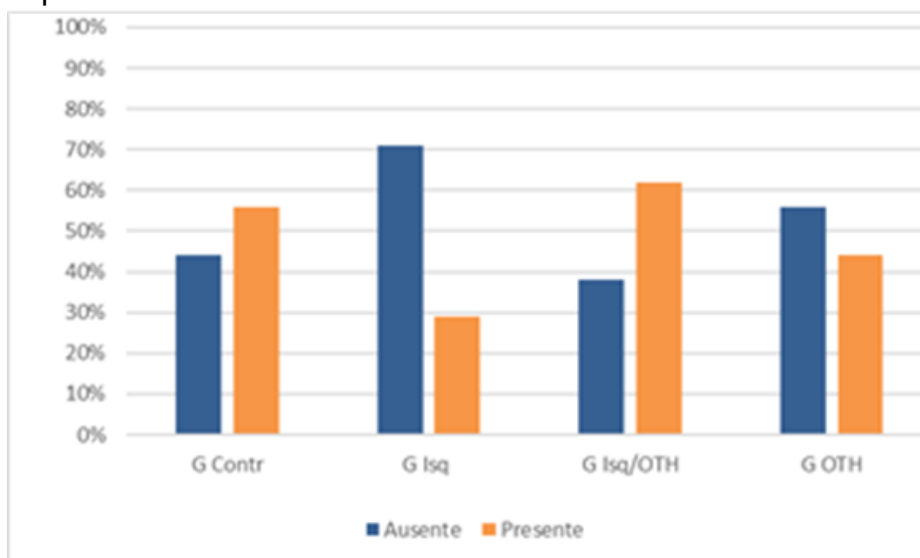


Figura 11 - Microscopia da cicatriz. Colônias bacterianas (asterisco verde). (HE, 200 X).

Foram constatadas colônias em todos os grupos e não houve diferença estatisticamente significativa na comparação (G Isq x G Isq/OTH) $p=0,315$ nem entre os grupos G Contr e G OTH ($p=1$, teste exato de Fisher).

Gráfico 11 - Frequência relativa da presença de colônias bacterianas por grupo experimental.



4.6.6 Corpo Estranho

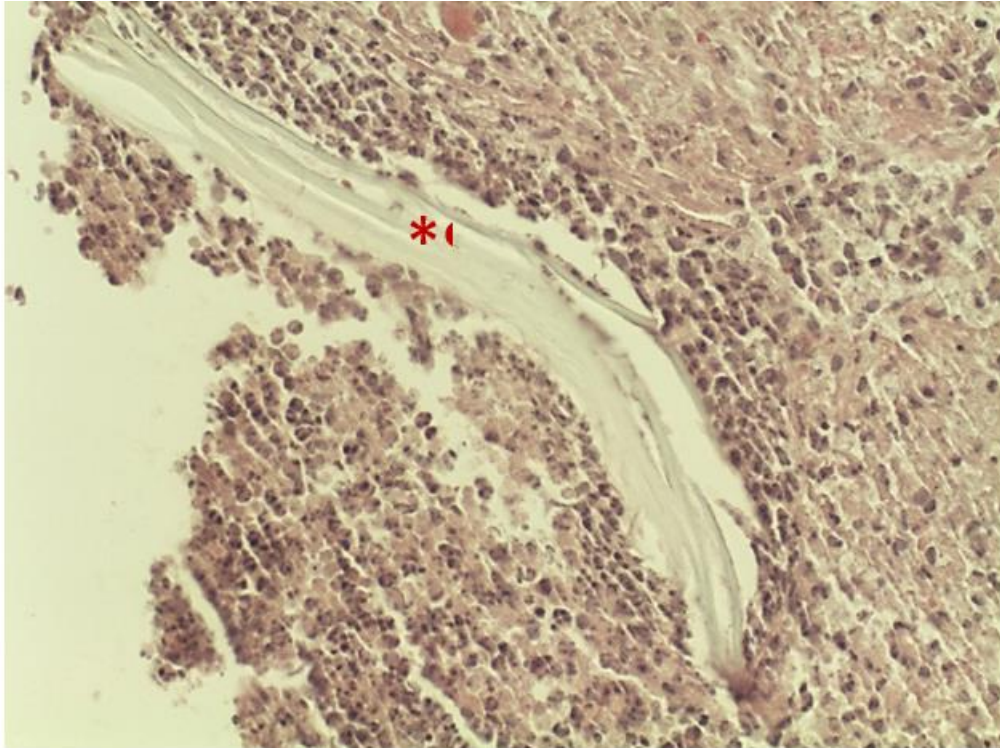
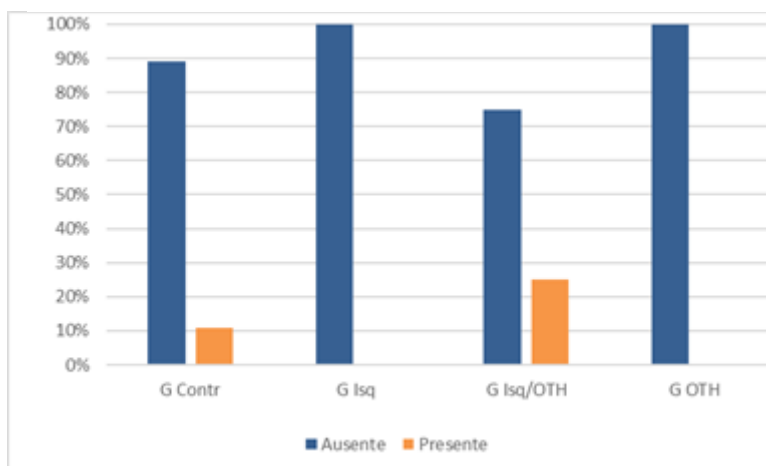


Figura 12 - Microscopia da cicatriz. Corpo estranho (asterisco vermelho). (HE, 200 X).

Não houve avaliação de lâminas com corpo estranho nos grupos G Isq e G OTH. A frequência relativa no G Contr foi de 11% e no G Isq/OTH de 25%, apesar disso não houve diferença estatisticamente significativa na comparação (G Isq x G Isq/OTH) $p=0,467$ nem entre os grupos G Contr e G OTH ($p=1$, teste exato de Fisher).

Gráfico 12 – Frequência relativa corpo estranho nos grupos experimentais.



4.6.7 Separação das Bordas da Ferida da operação

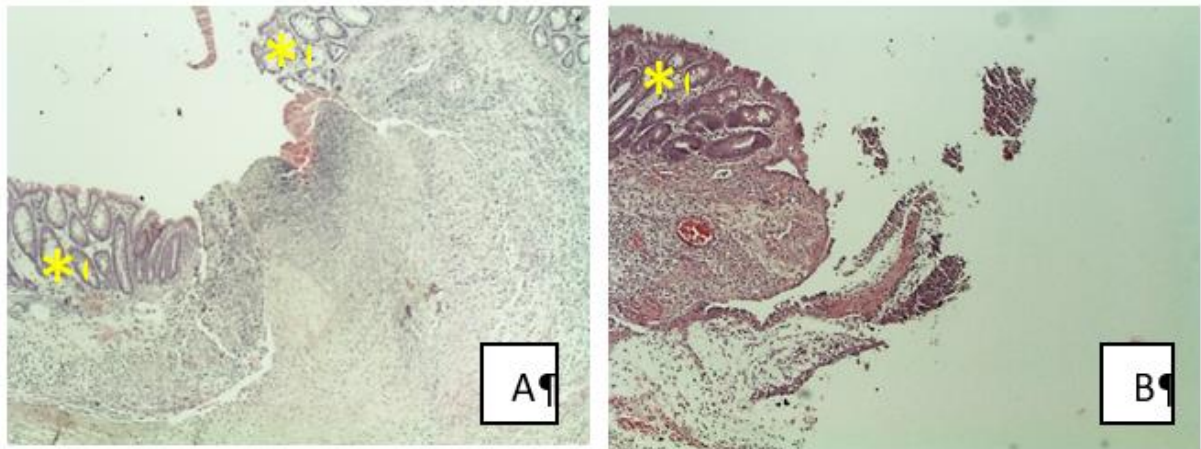
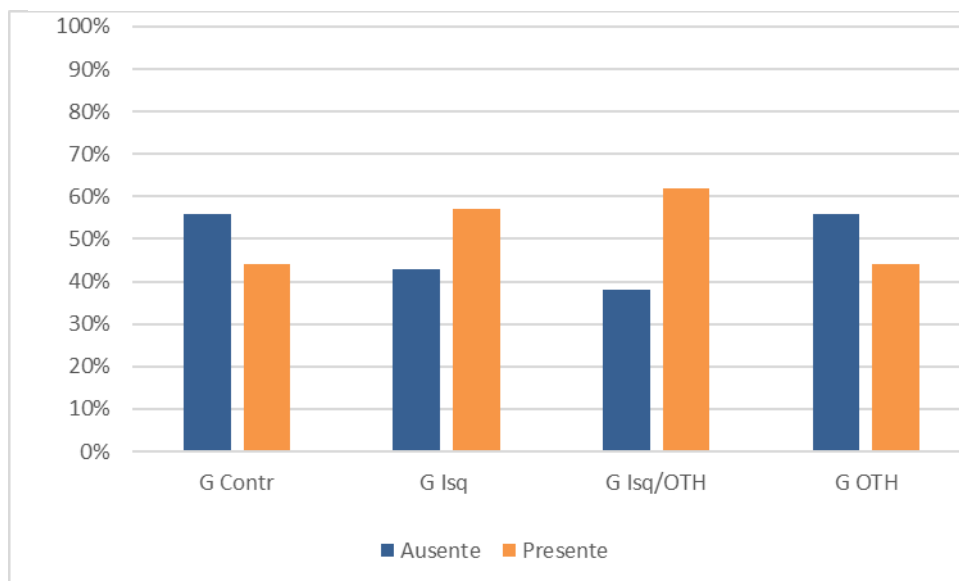


Figura 13 - Microscopia da cicatriz. Bordas unidas (A) e separadas (B). Mucosa (asterisco amarelo) (HE, 40 X).

Como pode ser visto no gráfico 13, os resultados foram semelhantes entre todos grupos e não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos pelo teste exato de Fisher ($p=1$), comparados dois a dois G Isq com G Isq/OTH G Contr com G OTH.

Gráfico 13 - Frequência relativa separação das bordas da ferida da operação.



4.6.8 Reepitelização nas bordas da ferida da operação

Houve reepitelização total apenas em 22,22% de animais do grupo controle, não houve reepitelização total em nenhum outro animal dos outros grupos. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos G Isq e G Isq/OTH $p=0,315$ (Exato de Fisher).

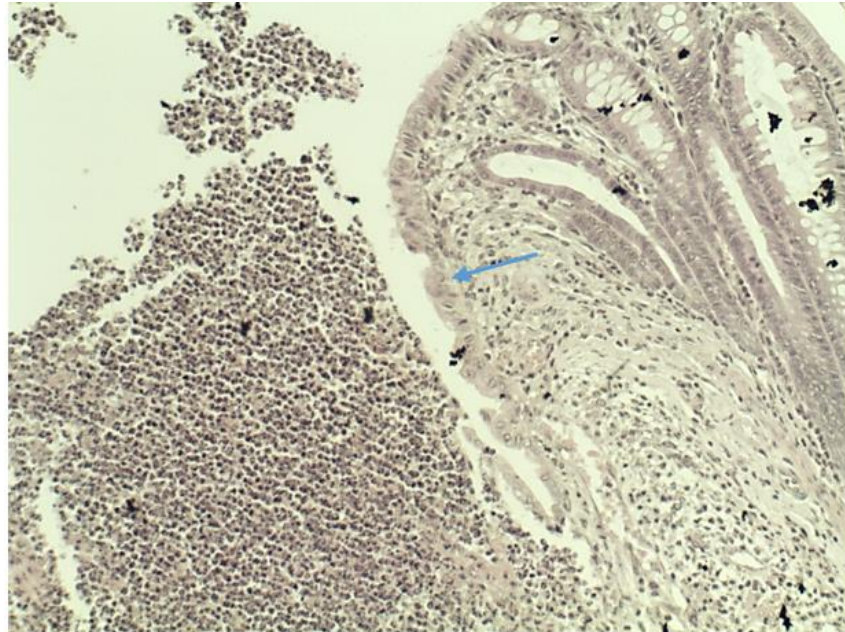
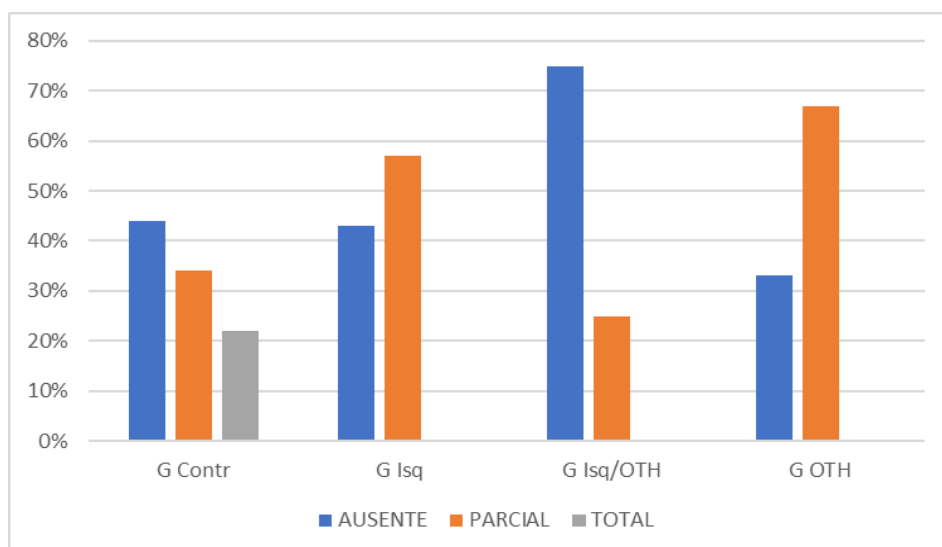


Figura 14 - Microscopia da cicatriz. Reepitelização (seta azul) (HE, 100 X).

Gráfico 14 - Frequência relativa de reepitelização nas bordas da ferida da operação entre grupos.



4.7 TEMPO DE DURAÇÃO DAS OPERAÇÕES

As medianas (primeiro quartil-terceiro quartil) foram G Contr 1h09min (1h02min-1h14min); G Isq 1h05min (59min-1h19min); G Isq/OTH 1h11min (1h07min-1h15min); G OHB 1h10min (1h05min-1h15min) (Apêndice J). Não houve diferença estatisticamente significativa no tempo de cirurgia entre os grupos $p= 0,386$ (três graus de liberdade, Kruskal-Wallis).

Gráfico 15 – Gráfico de caixa de tempos de cirurgia por grupo.

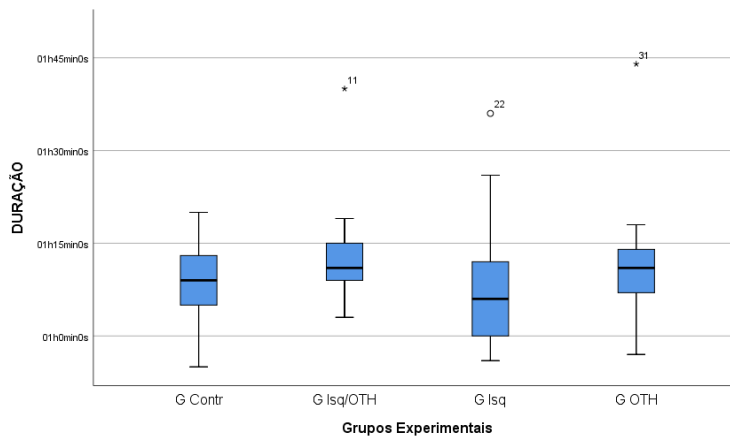
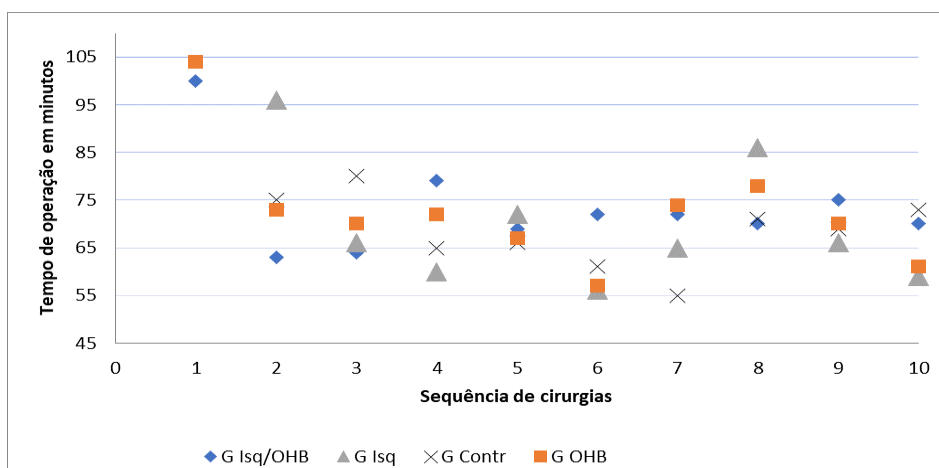


Gráfico 16 - Duração de operação por grupo experimental na sequência em que foram realizados.



5 DISCUSSÃO

Comparamos quatro grupos experimentais para verificar possíveis benefícios de um protocolo de oxigenioterapia hiperbárica constituído por duas sessões no pré e três no pós-operatório de ressecção e anastomose de segmento do cólon esquerdo. Dois grupos tiveram indução de isquemia, para comparar um grupo com isquemia induzida sem oxigenioterapia e outro grupo com indução e com sessões de oxigenioterapia.

Para compararmos, foram utilizados a evolução clínica, variação ponderal, avaliação macroscópica da cavidade abdominal e da anastomose na reoperação e também métodos para avaliação de cicatrização como estudo histopatológico e teste de resistência mecânica.

Há vários modelos experimentais para estudo. Como modelo animal foram escolhidas fêmeas jovens de ratas da linhagem isogênica LEW/HsdUnib.

Em revisão de 2016 por Bosmans et al, autores de 277 artigos publicados entre 1º de janeiro de 2000 e 31 de dezembro de 2014 receberam questionários para estabelecer consenso internacional a respeito do uso de modelos animais para pesquisa de anastomoses no trato gastrointestinal inferior⁴⁷. Trinta e cinco autores chegaram ao consenso em muitos tópicos, mas houve discordância se o modelo murino é adequado para estudos de anastomose. Muitos membros do painel opinaram que ratos não podem ser usados como modelo para vazamento anastomótico uma vez que são mais resistentes a infecções e mascaram sinais clínicos, enquanto outros membros do painel têm usado ratos para esse propósito por muitos anos com resultados satisfatórios⁴⁷.

A escolha por linhagem isogênica foi feita na expectativa de diminuir variação genética como fator confundidor, diminuir a variação de resposta dentro de cada grupo experimental e aumentar a reproducibilidade do trabalho experimental^{48,49}.

Existem poucos trabalhos experimentais publicados com uso de fêmeas, especialmente em cicatrização de anastomose colônica. Não foi encontrado nenhum artigo que relatasse diferença de cicatrização entre modelos animais machos e fêmeas, embora há relatos de maior incidência em homens do que mulheres de vazamento anastomótico⁵⁰⁻⁵².

Foram usados animais jovens e saudáveis. A idade em dias na data da operação variou de 112 a 133 com mediana de 128 dias (125-131). Parâmetros

reprodutivos podem ser usados para comparar a idade entre espécies. Ratas apresentam primeiro cio, o que seria equivalente a puberdade em humanos, em média em 50 dias (+/-10) e deixam de ter ciclos reprodutivos ao redor dos doze meses de idade, o que pode ser comparado com a menopausa da mulher. A vantagem em usar jovens adultas é diminuir fatores confundidores como outras morbidades associadas à idade ou à obesidade⁵³.

Ainda sobre a adequação da experimentação em modelos animais, aclimatação é relevante para sucesso. A definição do período de aclimatação varia muito conforme cada experimento. O período de aclimatação deste experimento foi considerável, de, pelo menos, 67 dias, a fim de adequar calendário dos participantes e disponibilidade do Laboratório de Cirurgia Experimental. Poderia ter sido mais curto sem prejuízo algum ao experimento.

Neste experimento, o investigador principal colocava suas mãos dentro da caixa, mantinha-as imóveis e aguardava até que os animais ficassem suficientemente calmos para tocar e cheirar suas mãos. A partir desse momento, iniciava cócegas no dorso e na barriga das ratas. Esse manejo não passava de um a dois minutos por caixa.

Depois disso, a manipulação prosseguia com a colocação das ratas nas caixas das sessões hiperbáricas enquanto eram avaliadas pelos critérios clínicos de monitoramento. Esse procedimento permitiu a habituação dos animais nas caixas e oportunidade para que o avaliador estabelecesse os padrões basais de cada critério.

Ratos têm diversos comportamentos sociais, e comportamentos lúdicos são fundamentais para a interação social deles, especialmente entre os mais jovens. Comportamentos lúdicos são altamente recompensadores e têm papel relevante para o desenvolvimento social, cognitivo e para o bem-estar do animal⁵⁴. O manipulador humano pode simular essas interações lúdicas, fazendo cócegas no dorso e na barriga do rato^{55,56}. Receber cócegas antes de procedimento afeta positivamente o rato e mitiga a aversão à manipulação e procedimentos, inclusive injeções, e assim melhora o bem-estar animal^{57,58}.

O uso do microscópio cirúrgico para síntese da anastomose colônica mostrou-se descomplicado e facilitou a visualização, resultando em técnica cirúrgica mais apurada.

A eletrocoagulação agilizou os procedimentos e facilitou em muito o tempo de espera e simulação dos grupos que não sofreram a indução da isquemia. Boa parte dos experimentos utilizaram a indução de isquemia por ligadura com fio cirúrgico.

A relevância do estudo da cicatrização colônica está fundamentada no vazamento anastomótico que persiste como grave complicação de cirurgias colorretais e a comunidade científica ainda busca maneiras viáveis para diminuir sua incidência.

As aderências intra-abdominais são complicações pós-operatórias frequentes após cirurgia abdominal e pélvica. Sempre que há uma complicação da cirurgia como deiscência e abscesso, aumenta a possibilidade de formação de aderência. A aderência pode inicialmente facilitar a resolução da complicação primária mas pode eventualmente causar desconforto como dor abdominal e mesmo obstruções intestinais que, muitas vezes, necessitam de operação⁵⁹.

O acompanhamento clínico revelou alterações discretas em todos os grupos, não houve necessidade de retirar nenhum animal por ponto final humanitário do experimento. Contração periorbital, abaulamento de focinho e bochecha, alteração de posicionamento de vibrissas, dorso arqueado e abdome inchado não foram demonstrados por nenhum animal em nenhum dos dias de observação.

O único animal que morreu no período pós-operatório, identificação 322, demonstrou apenas um sinal monitorado, a cromodacrioreia classificada como um (visível), sem demonstrar nenhum outro sinal clínico.

A cromodacrioreia foi mais constatada no quarto dia do experimento, com demonstração decrescente no quinto e sexto dia do experimento.

A redução da atividade foi mais evidente no quarto dia, foi mais discreta no quinto dia e não foi registrada no sexto dia.

Pelo menos um animal de cada grupo apresentou afundamento de flanco, todos os animais que apresentaram afundamento de flanco foram classificados como 1 (perceptível). Nenhum animal apresentou afundamento de flanco avaliado em 2 (evidente). Alguns animais apresentaram afundamento de flanco no quarto dia, outros animais apresentaram no sexto dia. Nenhum animal apresentou afundamento de flanco no quinto dia.

Os dois animais do grupo isquemia com fistula não demonstraram qualquer outro sinal além da cromodacrioreia, um deles apresentou a maior perda ponderal

relativa entre todos os grupos, de -13,82%, mas o segundo teve perda de apenas -5,8%, média do grupo Isquemia -8,9% (+/- 2,83).

A mortalidade global no presente estudo foi de 10% (4/40). Problemas durante anestesia foram responsáveis por 75% (3/4) dos óbitos, dois pelo uso de fentanil como um dos fármacos da anestesia balanceada e um pela tentativa de aprofundamento de plano anestésico pelo aumento na concentração de sevoflurano. Um dos óbitos ocorreu no pós-operatório no sexto dia do experimento. Não foi possível determinar a causa da morte porque na necropsia não foi identificada obstrução, peritonite, fistula ou qualquer outra alteração.

Chama a atenção que nenhum dos animais dos grupos que foram submetidos a OTH morreu.

Houve fístula apenas em dois animais do G Isq. Nenhum animal do G Isq/OTH apresentou fístula, bem como nenhum animal dos grupos Contr e G OTH.

Aparentemente a oxigenioterapia hiperbárica ofereceu algum benefício contra o aparecimento de fístula. Isso tem relevância clínica pela gravidade das consequências da fístula, apesar da diferença de frequência de fístula entre os grupos G Isq e G Isq/OTH não ter sido estatisticamente significativa.

Quando os desfechos morte e fístula foram analisados comparando os grupos que passaram (G OTH e G Isq OTH) e os que não passaram (G Contr e G Isq) houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (valor de $p= 0,036$ para teste exato de Fisher) favorecendo os animais que passaram pela oxigenioterapia hiperbárica. Isso sugere que a oxigenioterapia hiperbárica protegeu os animais desses dois eventos.

A proteção contra formação de fístula está diretamente relacionada ao processo de cicatrização da anastomose. Com relação ao evento morte, a possível proteção pode estar mais associada à anestesia do que à cicatrização, já que um animal morreu durante anestesia e o segundo animal morreu na véspera da reoperação. Nesse segundo animal, não foi observada nenhuma alteração na necropsia que pudesse ser imputada como *causa mortis*.

Na reoperação foram verificadas a presença e quantidade de aderências, abscessos, deiscência e fístula. Deiscência da anastomose é definida como a separação dos bordos suturados de uma ferida cirúrgica em qualquer ponto enquanto fístula é o vazamento do conteúdo intestinal na cavidade peritoneal. A fístula é sempre precedida de deiscência, enquanto nem toda deiscência resultará

em fístula, pois pode haver bloqueio de extravasamento por omento, por outros órgãos ou por aderência.

Neste trabalho, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos para o escore de Nair, avaliamos número e localização das aderências e não avaliamos resistência de forma semiquantitativa com foi realizado no trabalho de Bento et al⁶⁰.

Bento et al⁶⁰ compararam a adesão induzida por fio de seda na cavidade peritoneal de ratos em três grupos experimentais distintos. Um grupo sem oxigenioterapia hiperbárica, segundo grupo submetido a normóxia hiperbárica (21% de oxigênio a 2,5 ATA) e terceiro submetido a hiperóxia hiperbárica (100% de oxigênio a 2,5 ATA). A avaliação na necropsia realizada após eutanásia no sétimo dia após a operação classificou adesão como firme ou como frágil. O estudo histopatológico classificou de leve ou intenso os critérios de inflamação, proliferação vascular e fibrose.

Houve frequência maior de proliferação vascular classificada como intensa e de adesão classificada como frágil no grupo de hiperóxia hiperbárica e os autores sugeriram que sessões de oxigenioterapia hiperbárica podem ser úteis na prevenção de adesões mais intensas após laparotomia.

A oxigenioterapia hiperbárica tem sido usada como adjuvante na cicatrização de feridas complicadas, úlcera de decúbito e lesões do pé diabético. O uso como pré-condicionamento para operações com risco de isquemia e ou lesão de isquemia-reperfusão tem sido sugerido por alguns autores.

Foi demonstrado em trabalhos experimentais que sessões de oxigenioterapia hiperbárica não proporcionaram nenhum benefício aos animais nos grupos saudáveis³¹. Benefícios da oxigenioterapia hiperbárica foram demonstrados quando há agravo ou comorbidade.

As complicações mais induzidas nos modelos animais de estudos de cicatrização anastomótica relatadas em uma revisão sistemática foram isquemia, isquemia e reperfusão, obstrução intestinal, icterícia obstrutiva, peritonite, quimioterapia e radioterapia⁶¹. A isquemia no local da anastomose é um complicador em situações de operações colorretais, especialmente em pacientes oncológicos e por esse motivo o agravo escolhido para este trabalho foi isquemia.

Quanto às sessões de oxigenioterapia hiperbárica, não há consenso no número de sessões prévias, no intervalo entre sessões, no intervalo entre última sessão e a intervenção e no intervalo da primeira sessão após a intervenção.

Há indícios que protocolos mais intensos, com mais de uma sessão por dia têm melhores resultados^{6,12,17,62-64} e também pressurização de fundo de pelo menos 2,8 ATA⁶² têm obtido melhores resultados em detrimento de protocolos mais conservadores com menos sessões, com maior intervalo entre sessões ou com pressurização final menores^{13,65,66}.

No presente trabalho, optou-se pela reoperação no quarto dia, porque compreende fase crítica para vazamentos de anastomose colorretais e é período de transição entre as fases inflamatória aguda e proliferativa validado por inúmeras publicações.

Diversos autores de artigos sobre cicatrização separam grupos experimentais baseando-se nessas fases, investigando especialmente a fase inflamatória aguda ou na transição entre fase inflamatória aguda e proliferativa. O dia da reoperação e coleta de amostras pode variar, alguns autores investigaram no terceiro dia pós-operatório^{67,68}; no quarto dia^{6,13,17,65,66} e no quinto dia^{12,62}.

No nosso trabalho, nem isquemia tampouco oxigenioterapia induziram alterações que levassem a avaliação distinta entre os grupos nos parâmetros histopatológicos estudados. A isquemia induzida não produziu efeitos adversos que pudessem ser avaliados histopatologicamente no quarto dia. Isso sugere que o modelo de isquemia escolhido não tenha sido adequado para produzir diferenças detectáveis nos parâmetros histopatológicos no quarto dia, embora a isquemia induzida logrou produzir fistula em dois animais.

Sequer no parâmetro necrose isquêmica houve incidência maior no grupo isquemia, e até mesmo no parâmetro hemorragia e congestão não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Os resultados entre grupos foram estatisticamente idênticos nos parâmetros infiltrado mononuclear, neovascularização e edema. Os resultados nos parâmetros colágeno, fibroblastos e hemorragia e congestão foram estatisticamente semelhantes em todos os grupos.

A análise de correlação entre os parâmetros revelou forte correlação positiva entre fibroblastos e colágeno e entre microabscessos e infiltrado de polimorfonucleados. Essa correlação era esperada uma vez que fibroblastos

sintetizam colágeno e leucócitos polimorfonucleados têm função fagocitária e subsequente produção de reativos intermediários do oxigênio e nitrogênio.

Houve moderada correlação positiva entre neovascularização e fibroblastos e entre neovascularização e colágeno e entre fibroblastos e reepitelização.

Naqueles fatores que podem perturbar a cicatrização houve moderada correlação positiva entre crosta fibrinoleucocitária e ulceração, e entre crosta e separação das bordas da ferida da operação, bem como entre microabscesso e ulceração.

A separação das bordas da ferida cirúrgica correlacionou-se negativamente com fibroblastos e colágeno. A reepitelização correlacionou-se negativamente com crosta fibrinoleucocitária.

No que trata sobre testes mecânicos, tanto a pressão de ruptura quanto a força de ruptura foram consideradas apropriadas para avaliação mecânica da cicatriz anastomótica em consenso feito por questionário com 35 autores de 167 artigos⁴⁷. Para Rosin et al (1978) e Young e Wheeler (1983), a força de ruptura anastomótica é semelhante a pressão de ruptura, durante a primeira semana de pós-operatório^{69,70}.

No presente estudo, para avaliação de resistência mecânica optamos pela medição da força de ruptura. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Esse achado está em desacordo com trabalhos anteriores. Yagci et al em 2006 e Hamzaoglu et al em 1998^{17,62} relataram efeito positivo da oxigenioterapia hiperbárica nos parâmetros mecânicos e bioquímicos de anastomoses de cólon de ratos normais e com isquemia induzida. Todos animais do experimento, com exceção dos dois animais do grupo isquemia que tiveram fístula tiveram boa cicatrização.

Embora o conteúdo de hidroxiprolina seja considerado informativo sobre a quantidade de colágeno, decidiu-se por não determiná-lo neste trabalho posto que não fornece informações sobre os subtipos de colágeno, a maturidade do colágeno e, portanto, não necessariamente a força do tecido, uma vez que ela depende do tipo e qualidade do colágeno presente no tecido anastomótico^{71,72}.

Pontos que podem ser pesquisados em trabalhos futuros são outros protocolos mais intensos de OTH, com mais de uma sessão por dia, pressurização final maior como 2,8 ATA e talvez maior tempo de pressurização.

6 CONCLUSÃO

Nas condições em que este estudo foi realizado e baseado nos resultados obtidos, as sessões de oxigenioterapia hiperbáricas não influenciaram a cicatrização de anastomose colônica no quarto dia após operação nos critérios de resistência e nos critérios histopatológicos. Não houve óbito nem fístula nos animais submetidos a oxigenioterapia hiperbárica. Isso sugere que a oxigenioterapia hiperbárica protegeu os animais desses dois eventos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.Herrmann JB, Woodward SC, Pulaski EJ. Healing of colonic anastomoses in the rat. *Surg Gynecol Obstet* 1964;119:269-75.
- 2.Monavarian M, Kader S, Moeinzadeh S, Esmail J. Regenerative Scar-Free Skin Wound Healing. *Tissue Eng Part B Rev* 2019.
- 3.Reisinger KW, Poeze M, Hulsewe KW, van Acker BA, van Bijnen AA, Hoofwijk AG, Stoot JH, Derikx JP. Accurate prediction of anastomotic leakage after colorectal surgery using plasma markers for intestinal damage and inflammation. *J Am Coll Surg* 2014;219(4):744-51.
- 4.Sparreboom CL, van Groningen JT, Lingsma HF, Wouters M, Menon AG, Kleinrensink GJ, Jeekel J, Lange JF. Different Risk Factors for Early and Late Colorectal Anastomotic Leakage in a Nationwide Audit. *Dis Colon Rectum* 2018;61(11):1258-1266.
- 5.Santos Jr JCM. Post-surgical complications of the colorectal anastomosis. *Rev bras. colo-proctol.* 2011;31(1):98-106.
- 6.Adas M, Kemik O, Adas G, Arikan S, Kuntsal L, Kapran Y, Toklu AS. Is combined therapy more effective than growth hormone or hyperbaric oxygen alone in the healing of left ischemic and non-ischemic colonic anastomoses? *Clinics (Sao Paulo)* 2013;68(11):1440-5.
- 7.Due SL, Wattoo DA, Sweeney JL, Milliken L, Luke CG. Colorectal cancer surgery 2000-2008: evaluation of a prospective database. *ANZ J Surg* 2012;82(6):412-9.
- 8.Oines MN, Krarup PM, Jorgensen LN, Agren MS. Pharmacological interventions for improved colonic anastomotic healing: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2014;20(35):12637-48.
- 9.Leach RM, Rees PJ, Wilmschurst P. Hyperbaric oxygen therapy. *BMJ* 1998;317(7166):1140-3.
- 10.Jain KK. *Textbook of Hyperbaric Medicine*. Basel,Switzerland: Springer; 2017. 640 p.
- 11.Sherlock S. ECHM Consensus Conference and levels of evidence. *Diving Hyperb Med* 2017;47(2):133.
- 12.Yildiz R, Can MF, Yagci G, Ozgurtas T, Guden M, Gamsizkan M, Ozturk E, Cetiner S. The effects of hyperbaric oxygen therapy on experimental colon anastomosis after preoperative chemoradiotherapy. *Int Surg* 2013;98(1):33-42.
- 13.Rocha AA, Leal RF, Ayrizono Mde L, Chung WF, Coy CS, Lee HD, Fagundes JJ. Hyperbaric oxygen therapy and mechanical resistance of the colonics anastomosis in rats with peritonitis. *Acta Cir Bras* 2010;25(4):368-74.
- 14.Azevedo LA, Parra RS, Da Rocha JJ, Ramalho LN, Ramalho FS, Feres O. Hyperbaric oxygen on the healing of ischemic colonic anastomosis--an experimental study in rats. *Undersea Hyperb Med* 2010;37(6):405-11.
- 15.Lionco JD, Lionco LC, Filippi LT, Lionco CC, Volkweiss B, Gurski RR. Effect of hyperbaric oxygen therapy on esophagojejunal anastomosis healing in rats. *Acta Cir Bras* 2008;23(6):491-6.
- 16.Gu GJ, Li YP, Peng ZY, Xu JJ, Kang ZM, Xu WG, Tao HY, Ostrowski RP, Zhang JH, Sun XJ. Mechanism of ischemic tolerance induced by hyperbaric oxygen preconditioning involves upregulation of hypoxia-inducible factor-1alpha and erythropoietin in rats. *J Appl Physiol (1985)* 2008;104(4):1185-91.
- 17.Hamzaoglu I, Karahasanoglu T, Aydin S, Sahin DA, Carkman S, Sariyar M, Alemdaroglu K. The effects of hyperbaric oxygen on normal and ischemic colon anastomoses. *Am J Surg* 1998;176(5):458-61.

18. Pomeroy BD, Keim LW, Taylor RJ. Preoperative hyperbaric oxygen therapy for radiation induced injuries. *J Urol* 1998;159(5):1630-2.
19. Vudiniabola S, Pirone C, Williamson J, Goss AN. Hyperbaric oxygen in the prevention of osteoradionecrosis of the jaws. *Aust Dent J* 1999;44(4):243-7.
20. Dong H, Xiong L, Zhu Z, Chen S, Hou L, Sakabe T. Preconditioning with hyperbaric oxygen and hyperoxia induces tolerance against spinal cord ischemia in rabbits. *Anesthesiology* 2002;96(4):907-12.
21. Pedoto A, Nandi J, Yang ZJ, Wang J, Bosco G, Oler A, Hakim TS, Camporesi EM. Beneficial effect of hyperbaric oxygen pretreatment on lipopolysaccharide-induced shock in rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2003;30(7):482-8.
22. Mori H, Shinohara H, Arakawa Y, Kanemura H, Ikemoto T, Imura S, Morine Y, Ikegami T, Yoshizumi T, Shimada M. Beneficial effects of hyperbaric oxygen pretreatment on massive hepatectomy model in rats. *Transplantation* 2007;84(12):1656-61.
23. Yogaratnam JZ, Laden G, Guvendik L, Cowen M, Cale A, Griffin S. Hyperbaric oxygen preconditioning improves myocardial function, reduces length of intensive care stay, and limits complications post coronary artery bypass graft surgery. *Cardiovasc Revasc Med* 2010;11(1):8-19.
24. Kallet RH, Matthay MA. Hyperoxic Acute Lung Injury. *Respir Care* 2013;58(1):123-41.
25. Wingelaar TT, van Ooij P, van Hulst RA. Oxygen Toxicity and Special Operations Forces Diving: Hidden and Dangerous. *Front Psychol* 2017;8.
26. Research NCfRRaRoAi. 2018 14 de outubro de 2018. Animal Research: Reporting of in vivo Experiments. <<https://www.nc3rs.org.uk/arrive-guidelines>>. 14 de outubro de 2018.
27. Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Animal research: reporting in vivo experiments: the ARRIVE guidelines. *Br J Pharmacol* 2010;160(7):1577-9.
28. Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *Osteoarthritis Cartilage* 2012;20(4):256-60.
29. Cuenca AMB, Andrade MTD, Noronha DP, Ferraz MLE, Buchalla CM, Estornilho Filho J. Guia de Apresentação de Teses. 2ª Ed ed. atual. ed. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2017.
30. Flecknell P. Laboratory Animal Anaesthesia. Oxford, Reino Unido: Academic Press Elsevier; 2016.
31. Latimer CR, Lux CN, Roberts S, Drum MG, Braswell C, Sula MJM. Effects of hyperbaric oxygen therapy on uncomplicated incisional and open wound healing in dogs. *Vet Surg* 2018;47(6):827-836.
32. Priolli DG, Silva PL, Betini AM, Pereira JA, Margarido NF, Martinez CA. Is peritoneal reflection the best anatomical repair landmark in experimental colorectal surgery on rats? *Acta Cir Bras* 2009;24(6):484-9.
33. ALMEIDA RM. Avaliação dos efeitos do hemissulfato de s-metilisotiouréia, um inibidor da enzima óxido nítrico sintase induzível, sobre a cicatrização de anastomoses colônicas em ratos.: Universidade de Brasília; 2006.
34. Duraes Lde C, Farias IE, Morais PH, Oliveira PG, Cavalcanti Neto FF, Lino Junior RS, Feres O, Sousa JB. The effect of carbon dioxide pneumoperitoneum on the healing colonic anastomosis in rats. *Acta Cir Bras* 2013;28(9):670-7.
35. Nair SK, Bhat IK, Aurora AL. Role of proteolytic enzyme in the prevention of postoperative intraperitoneal adhesions. *Arch Surg* 1974;108(6):849-53.

- 36.Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S, Glick S, Ingrao J, Klassen-Ross T, Lacroix-Fralish ML and others. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods* 2010;7(6):447-9.
- 37.Sotocinal SG, Sorge RE, Zaloum A, Tuttle AH, Martin LJ, Wieskopf JS, Mapplebeck JC, Wei P, Zhan S, Zhang S and others. The Rat Grimace Scale: a partially automated method for quantifying pain in the laboratory rat via facial expressions. *Mol Pain* 2011;7:55.
- 38.De Rantere D, Schuster CJ, Reimer JN, Pang DS. The relationship between the Rat Grimace Scale and mechanical hypersensitivity testing in three experimental pain models. *Eur J Pain* 2016;20(3):417-26.
- 39.Oliver V, De Rantere D, Ritchie R, Chisholm J, Hecker KG, Pang DS. Psychometric assessment of the Rat Grimace Scale and development of an analgesic intervention score. *PLoS One* 2014;9(5):e97882.
- 40.Humane Endpoints for Animals in Pain. In: Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals. National Research Council (US) Committee on Recognition and Alleviation of Pain in Laboratory Animals.: National Academies Press (US); 2009.
- 41.Rodrigues CFS, Lima FJC, Barbosa FT. [Importance of using basic statistics adequately in clinical research]. *Rev Bras Anesthesiol* 2017;67(6):619-625.
- 42.Bailar JC, 3rd, Mosteller F. Guidelines for statistical reporting in articles for medical journals. Amplifications and explanations. *Ann Intern Med* 1988;108(2):266-73.
- 43.Lang TA, Secic M. How to Report Statistics in Medicine:Annotated Guidelines for Authors, Editors, and Reviewers. Philadelphia: American College of Physicians; 2006. 490 p.
- 44.Callegari-Jacques SM. Bioestatística princípios e aplicações. Porto Alegre, RS, Brasil: Artmed Editora SA,2003; 2003. 255 p.
- 45.Normando D, Tjäderhane L, Universidade de Oulu F, Quintão CCA, Janeiro UdEdRd. A PowerPoint®-based guide to assist in choosing the suitable statistical test. *Dental Press J. Orthod.* 2010;15(1):101-106.
- 46.Bate ST, Clark RA. The design and statistical analysis of animal experiments. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press; 2014. 310 p.
- 47.Bosmans JW, Moosdorff M, Al-Taher M, van Beek L, Derikx JP, Bouvy ND. International consensus statement regarding the use of animal models for research on anastomoses in the lower gastrointestinal tract. *Int J Colorectal Dis* 2016;31(5):1021-30.
- 48.Festing MF. Inbred strains should replace outbred stocks in toxicology, safety testing, and drug development. *Toxicol Pathol* 2010;38(5):681-90.
- 49.Festing MF. Evidence should trump intuition by preferring inbred strains to outbred stocks in preclinical research. *Ilar j* 2014;55(3):399-404.
- 50.Bertelsen CA, Andreasen AH, Jorgensen T, Harling H. Anastomotic leakage after anterior resection for rectal cancer: risk factors. *Colorectal Dis* 2010;12(1):37-43.
- 51.Eriksen MT, Wibe A, Norstein J, Haffner J, Wiig JN. Anastomotic leakage following routine mesorectal excision for rectal cancer in a national cohort of patients. *Colorectal Dis* 2005;7(1):51-7.
- 52.Abou-Ismaïl UA, Burman OH, Nicol CJ, Mendl M. The effects of enhancing cage complexity on the behaviour and welfare of laboratory rats. *Behav Processes* 2010;85(2):172-80.
- 53.Martin B, Ji S, Maudsley S, Mattson MP. "Control" laboratory rodents are metabolically morbid: why it matters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107(14):6127-33.

54. van Kerkhof LW, Damsteegt R, Trezza V, Voorn P, Vanderschuren LJ. Social play behavior in adolescent rats is mediated by functional activity in medial prefrontal cortex and striatum. *Neuropsychopharmacology* 2013;38(10):1899-909.
55. Rygula R, Pluta H, Popik P. Laughing rats are optimistic. *PLoS One* 2012;7(12):e51959.
56. Burgdorf J, Panksepp J. Tickling induces reward in adolescent rats. *Physiol Behav* 2001;72(1-2):167-73.
57. Cloutier S, Panksepp J, Newberry RC. Playful handling by caretakers reduces fear of humans in the laboratory rat. 2012;140(Issues 3–4):161–171.
58. Cloutier S, Wahl KL, Panksepp J, Newberry, R.C. Playful handling of laboratory rats is more beneficial when applied before than after routine injections - *Applied Animal Behaviour Science*. *Applied Animal Behaviour Science* 2016;164:81–90.
59. Rocca A, Aprea G, Surfaro G, Amato M, Giuliani A, Paccone M, Salzano A, Russo A, Tafuri D, Amato B. Prevention and treatment of peritoneal adhesions in patients affected by vascular diseases following surgery: a review of the literature. *Open Med (Wars)* 2016;11(1):106-14.
60. Bento SV, Nunes TA, Araujo ID, Silva R, Vidigal PVT, Carvalhais RM. Hyperbaric oxygenation on adhesions prevention after laparotomy in rats. *Acta Cir Bras* 2018;33(9):824-833.
61. Nerstrom M, Krarup PM, Jorgensen LN, Agren MS. Therapeutic improvement of colonic anastomotic healing under complicated conditions: A systematic review. *World J Gastrointest Surg* 2016;8(5):389-401.
62. Yagci G, Ozturk E, Ozgurtas T, Gorgulu S, Kutlu OC, Topal T, Cetiner S, Tufan T. Preoperative and postoperative administration of hyperbaric oxygen improves biochemical and mechanical parameters on ischemic and normal colonic anastomoses. *J Invest Surg* 2006;19(4):237-44.
63. Guzel S, Sunamak O, As A, Celik V, Ferahman M, Nuri MM, Gazioglu E, Atukeren P, Mutlu O. Effects of hyperbaric oxygen and Pgg-glucan on ischemic colon anastomosis. *World J Gastroenterol* 2006;12(9):1421-5.
64. Kemik O, Adas G, Arikan S, Gurluler E, Dogan Y, Toklu AS, Kapran Y, Kuntsal L, Purisa S, Kemik A. Evaluation of the effects of hyperbaric oxygen treatment and enoxaparin on left colon anastomosis. An experimental study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2013;17(17):2286-92.
65. Rocha AA, Coy CS, Goes JR, de Ayrizono ML, Wu FC, Fagundes JJ. [Comparative study of the hyperbaric hyperoxygenation in ischemic colonic loops in rats]. *Acta Cir Bras* 2005;20(2):152-8.
66. Rocha AA, Coy CS, Goes JR, Ayrizono Mde L, Wu FC, Fagundes JJ. Comparative study of the hyperbaric hyperoxygenation in ischemic colonic loops in rats. *Acta Cir Bras* 2007;22(2):85-91.
67. Boersema GS, Wu Z, Kroese LF, Vennix S, Bastiaansen-Jenniskens YM, van Neck JW, Lam KH, Kleinrensink GJ, Jeekel J, Lange JF. Hyperbaric oxygen therapy improves colorectal anastomotic healing. *Int J Colorectal Dis* 2016;31(5):1031-8.
68. Daniel RA, Cardoso VK, Gois Jr E, Parra RS, Garcia SB, Rocha JJ, Feres O. Effect of hyperbaric oxygen therapy on the intestinal ischemia reperfusion injury. *Acta Cir Bras* 2011;26(6):463-9.
69. Rosin RD, Exarchakos G, Gilmore OJ, Ellis H. Topical noxythiolin in colonic healing. *Br J Surg* 1978;65(9):603-6.
70. Young HL, Wheeler MH. Collagenase inhibition in the healing colon. *J R Soc Med* 1983;76(1):32-6.
71. Bosmans JW, Jongen AC, Bouvy ND, Derikx JP. Colorectal anastomotic healing: why the biological processes that lead to anastomotic leakage should be revealed prior to conducting intervention studies. *BMC Gastroenterol* 2015;15:180.

72. Koruda MJ, Rolandelli RH. Experimental studies on the healing of colonic anastomoses. *J Surg Res* 1990;48(5):504-15.

APÊNDICES

APÊNDICE A – identificação dos animais pelo número de chip eletrônico implantado e pelo número pelos quais foram citados no texto.

identificação Microchip	Número pelo qual foi citado no texto	caix a	Grupo Experimental
963008000803291	291	3	G Isq/OTH
963008000803292	292	3	G OTH
963008000803293	293	3	G Isq
963008000803294	294	3	G Contr
963008000803295	295	1	G Isq/OTH
963008000803296	296	1	G OTH
963008000803297	297	1	G Isq
963008000803298	298	1	G Contr
963008000803299	299	5	G Isq/OTH
963008000803300	300	5	G OTH
963008000803301	301	5	G Isq
963008000803302	302	5	G Contr
963008000803303	303	9	G Isq/OTH
963008000803304	304	9	G OTH
963008000803305	305	9	G Isq
963008000803306	306	9	G Contr
963008000803307	307	2	G Isq/OTH
963008000803308	308	2	G OTH
963008000803309	309	2	G Isq
963008000803310	310	2	G Contr
963008000803311	311	4	G Isq/OTH
963008000803312	312	4	G OTH
963008000803313	313	4	G Isq
963008000803314	314	4	G Contr
963008000803315	315	8	G Isq/OTH
963008000803316	316	8	G OTH
963008000803317	317	8	G Isq
963008000803318	318	8	G Contr
963008000803319	319	6	G Isq/OTH
963008000803320	320	6	G OTH
963008000803321	321	6	G Isq
963008000803322	322	6	G Contr
963008000803323	323	7	G Isq/OTH
963008000803324	324	7	G OTH
963008000803325	325	7	G Isq
963008000803326	326	7	G Contr
963008000803327	327	10	G Isq/OTH
963008000803328	328	10	G OTH
963008000803329	329	10	G Isq
963008000803330	330	10	G Contr

APÊNDICE B - Materiais de consumo utilizados.

Descrição	nome comercial	data fabricação	data de validade	lote
fio inabsorvível de prolipropileno 5-0 75 cm duas agulhas 1/2, 1,7 cm ponta cilíndrica	Surgipro II 2 x MQ17	18 fev 16	16 fev21	1600968C
monofilamento nylon 6-0 agulha 3/8 16,5 mm	NY64CT16	abr 16	abr 21	16160502
Ração para ratos e camundongos	Presence Ratos e Camundongos	26/05/2017	22/11/2017	41EX170060729 Cod 05.7883.40.20
midazolam	Midazolam		30/11/2018	AP 186/16
Servoflurano	Sevocris	02/2016	02/2018	16021195
lubrificante oftálmico	Systane UL Alcon	06/2016	01/2020	

APÊNDICE C - Controle de temperatura e umidade no alojamento dos animais.

Dia e Mês (2017)	temperatura máxima	temperatura média	temperatura mínima	umidade máxima	umidade média	umidade mínima
12/8	26,1	25,35	24,6	57	47	37
15/8	26,6	25,45	24,3	46	39	32
16/8	26,7	25,7	24,7	46	41,5	37
17/8	26,3	25,35	24,4	46	42	38
18/8	26,5	25,55	24,6	60	49,5	39
19/8	26,9	25,75	24,6	60	48,5	37
21/8	27,2	26,15	25,1	52	43,5	35
22/8	27,3	26,3	25,3	53	48,5	44
23/8	27,3	25,75	24,2	56	50	44
24/8	25,2	24,4	23,6	69	61	53
25/8	24,6	23,9	23,2	68	61	54
26/8	25,1	24,2	23,3	59	52,5	46
27/8	25,6	24,7	23,8	48	43	38
28/8	25,9	25,1	24,3	43	39	35
29/8	26,8	25,7	24,6	43	35,5	28
30/8	27	25,85	24,7	41	32	23
31/8	26,8	25,75	24,7	59	47	35
1/9	26,7	25,7	24,7	64	52	40
2/9	26,9	25,6	24,3	67	54	41
3/9	25,7	24,6	23,5	73	61	49
4/9	24,9	24,2	23,5	71	63,5	56

APÊNDICE D - Estatísticas do controle de temperatura e umidade do alojamento dos animais.

		temperatura máxima	temperatura média	temperatura mínima	umidade máxima	umidade média dia	umidade mínima
Valor p (Saphiro-wilk)		0,063	0,039	0,096	0,266	0,631	0,564
Média		26,29	25,29	24,29	56,24	48,14	40,05
Desvio Padrão		0,82	0,68	0,59	10,03	8,73	8,30
Erro padrão		0,18	0,15	0,13	2,19	1,91	1,81
95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	25,92	24,98	24,02	51,67	44,17	36,27
	Limite superior	26,66	25,60	24,55	60,81	52,12	43,83
Mediana		26,60	25,55	24,40	57,00	48,50	38,00
Amplitude interquartílica		1,25	1,10	1,00	19,50	11,50	10,00
Variância		0,68	0,47	0,34	100,69	76,28	68,95
Mínimo		24,60	23,90	23,20	41,00	32,00	23,00
Máximo		27,30	26,30	25,30	73,00	63,50	56,00
Intervalo		2,70	2,40	2,10	32,00	31,50	33,00
Valor p (Saphiro-wilk)		0,063	0,039	0,096	0,266	0,631	0,564

APÊNDICE E - Cronograma dos procedimentos

animais	7 a 10	11 a 14	15 a 18	19 a 22	23 a 26	27 a 30	31 a 33	34 a 37	38 a 41	42 a 45
Procedimento	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
dia	OTH									
13	OTH	OTH								
14	CirOTH*	OTH	OTH							
15	OTH	CirOTH	OTH							
16	OTH	OTH	CirOTH							
17	OTH	OTH	OTH							
18	Reoper**	OTH	OTH							
19		Reoper	OTH	OTH						
20			Reoper	OTH	OTH					
21				CirOTH	OTH	OTH				
22				OTH	CirOTH	OTH				
23				OTH	OTH	CirOTH				
24				OTH	OTH	OTH				
25				Reoper	OTH	OTH				
26					Reoper	OTH	OTH			
27						Reoper	OTH	OTH		
28							CirOTH	OTH	OTH	
29							OTH	CirOTH	OTH	OTH
30							OTH	OTH	CirOTH	OTH
31							OTH	OTH	OTH	CirOTH
1							Reoper	OTH	OTH	OTH
2								Reoper	OTH	OTH
3									Reoper	OTH
4										Reoper

* CirOTH Laparatomia pela manhã e sessão de oxigenioterapia hiperbárica à tarde

** Reoperação

Os procedimentos foram iniciados em 13 de agosto de 2017 e finalizados em 4 de setembro.

APÊNDICE F - Idade no dia da operação.

identificação	data de nascimento	caixa	idade em dias	idade em meses
963008000803295	12-abr	1	124	4,1
963008000803296	5-abr	1	131	4,4
963008000803297	5-abr	1	131	4,4
963008000803298	5-abr	1	131	4,4
963008000803307	5-abr	2	132	4,4
963008000803308	5-abr	2	132	4,4
963008000803309	5-abr	2	132	4,4
963008000803310	5-abr	2	132	4,4
963008000803291	12-abr	3	126	4,2
963008000803292	12-abr	3	126	4,2
963008000803293	12-abr	3	126	4,2
963008000803294	12-abr	3	126	4,2
963008000803311	12-abr	4	131	4,4
963008000803312	12-abr	4	131	4,4
963008000803313	12-abr	4	131	4,4
963008000803314	12-abr	4	131	4,4
963008000803299	19-abr	5	125	4,2
963008000803300	19-abr	5	125	4,2
963008000803301	19-abr	5	125	4,2
963008000803302	19-abr	5	125	4,2
963008000803319	19-abr	6	126	4,2
963008000803320	19-abr	6	126	4,2
963008000803321	19-abr	6	126	4,2
963008000803322	19-abr	6	126	4,2
963008000803323	19-abr	7	130	4,3
963008000803324	19-abr	7	130	4,3
963008000803325	19-abr	7	130	4,3
963008000803326	19-abr	7	130	4,3
963008000803315	19-abr	8	131	4,4
963008000803316	19-abr	8	131	4,4
963008000803317	19-abr	8	131	4,4
963008000803318	19-abr	8	131	4,4
963008000803303	19-abr	9	133	4,4
963008000803304	10-mai	9	112	3,7
963008000803305	10-mai	9	112	3,7
963008000803306	10-mai	9	112	3,7
963008000803327	10-mai	10	113	3,8
963008000803328	10-mai	10	113	3,8
963008000803329	10-mai	10	113	3,8
963008000803330	10-mai	10	113	3,8

APÊNDICE G - Estatísticas de idade no dia da operação.

Valor de p Saphiro-wilk		0,00000
Mediana		128
Primeiro quartil-terceiro quartil		122-134
Média		126,05
Desvio Padrão		6,80
Erro padrão		1,08
95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	123,87
	Limite superior	128,23
5% da média aparada		126,47
Variância		46,25
Mínimo		112
Máximo		133
Intervalo		21

APÊNDICE H - Sessões oxigenioterapia hiperbárica.

número da sessão	caixas	início pressurização	chegada ao fundo	tempo de pressurização	velocidade de pressurização ATA/MIN	saída fundo	Tempo de fundo	término da sessão	tempo de despressurização em minutos	velocidade de despressurização em ATA/min	tempo total da sessão em minutos
1	1	13:53	14:12	00:19	0,07	15:12	01:00	15:23	00:11	0,13	90
2	1,2	14:43	14:54	00:11	0,13	15:54	01:00	16:20	00:26	0,05	97
3	1,2,3	14:18	14:44	00:26	0,05	15:44	01:00	16:12	00:28	0,05	114
4	1,2,3	14:31	14:50	00:19	0,07	15:50	01:00	16:14	00:24	0,06	103
5	1,2,3	14:58	15:19	00:21	0,07	16:19	01:00	16:46	00:27	0,05	108
6	1,2,3	15:08	15:32	00:24	0,06	16:32	01:00	16:52	00:20	0,07	104
7	2,3	15:45	16:10	00:25	0,06	17:10	01:00	17:30	00:20	0,07	105
8	3,4	15:10	15:34	00:24	0,06	16:34	01:00	16:56	00:22	0,06	106
9	4,5	15:02	15:20	00:18	0,08	16:20	01:00	16:56	00:36	0,04	114
10	4,5,6	15:02	15:21	00:19	0,07	16:21	01:00	16:39	00:18	0,08	97
11	4,5,6	15:06	15:28	00:22	0,06	16:28	01:00	16:45	00:17	0,08	99
12	4,5,6	14:57	15:13	00:16	0,09	16:13	01:00	16:29	00:16	0,09	92
12	4,5,6	15:16	15:35	00:19	0,07	16:35	01:00	16:55	00:20	0,07	99
14	4,5	15:03	15:25	00:22	0,06	16:25	01:00	16:41	00:16	0,09	98
15	6,7	14:56	15:11	00:15	0,09	16:11	01:00	16:26	00:15	0,09	90
16	7,8	14:29	14:49	00:20	0,07	15:49	01:00	16:08	00:19	0,07	99
17	7,8,9	15:02	15:22	00:20	0,07	16:22	01:00	16:41	00:19	0,07	99
18	10	15:13	15:31	00:18	0,08	16:31	01:00	16:53	00:22	0,06	100
19	10	14:57	15:20	00:23	0,06	16:20	01:00	16:39	00:19	0,07	102
20	10	15:14	15:33	00:19	0,07	16:33	01:00	16:53	00:20	0,07	99
21	0	16:09	16:27	00:18	0,08	17:29	01:02	17:48	00:19	0,07	99
22	9,10	15:09	15:28	00:19	0,07	16:28	01:00	16:48	00:20	0,07	99
23	10	15:05	15:24	00:19	0,07	16:24	01:00	16:45	00:21	0,07	100

APÊNDICE I - Fichas de controle de anestesia por animal.

	caixa	idade dia da operação	peso	Hora indução	início operação	fim operação	DURAÇÃO	midazolam 5mg/kg 5mg/ml	cetamina 75mg/kg 50mg/ml	HORA/% sevoflurano início 0,25%
295	1	124	235	11:32	11:50	13:30	1:40	0,2	0,4	
296	1	131	242	10:00	10:11	11:55	1:44	0,2	0,4	
297	1	131	208	9:15	9:37	-	-	0,2	0,3	ÓBITO
298	1	131	215	8:03	8:20	-	-	0,2	0,3	ÓBITO
307	2	132	229	9:00	9:25	10:28	1:03	0,2	0,3	0,50% 1% 10:05
308	2	132	230	7:37	8:00	9:13	1:13	0,2	0,3	
309	2	132	241	10:28	11:07	12:43	1:36	0,2	0,4	
310	2	132	242	13:36	13:00	14:15	1:15	0,2	0,4	1%
291	3	126	220	9:37	9:58	11:02	1:04	0,2	0,3	
292	3	126	188	10:51	11:20	12:30	1:10	0,2	0,3	
293	3	126	220	12:27	12:49	13:55	1:06	0,2	0,3	
294	3	126	207	8:18	8:30	9:50	1:20	0,2	0,3	
311	4	131	220	10:59	11:11	12:30	1:19	0,2	0,3	11:45 0,5%
312	4	131	220	8:08	8:35	9:47	1:12	0,2	0,3	0,5% toda operação
313	4	131	251	9:39	9:56	10:56	1:00	0,3	0,4	10:20 1%
314	4	131	218	12:19	12:42	13:47	1:05	0,2	0,3	12:57 0,5%
299	5	125	214	11:53	12:15	13:24	1:09	0,2	0,3	
300	5	125	213	10:32	10:50	11:57	1:07	0,2	0,3	11:46 0,5%
301	5	125	223	7:44	8:10	9:22	1:12	0,2	0,3	
302	5	125	216	9:13	9:30	10:36	1:06	0,2	0,3	10:26 0,5%
319	6	126	215	7:59	8:18	9:30	1:12	0,2	0,3	09:07:00 0,5%
320	6	126	215	10:32	11:10	12:07	0:57	0,2	0,3	11:05:00 0,5%
321	6	126	213	12:01	12:21	13:17	0:56	0,2	0,3	
322	6	126	206	9:24	9:43	10:44	1:01	0,2	0,3	9:38 0,5%
323	7	130	212	8:17	8:41	9:53	1:12	0,2	0,3	9:20 1% 9:25 1,25%
324	7	130	219	11:00	11:06	12:20	1:14	0,2	0,3	11:13:00 1% 11:19 1,5%
325	7	130	212	9:48	10:03	11:08	1:05	0,2	0,3	
326	7	130	231	12:16	12:41	13:36	0:55	0,2	0,3	
315	8	131	212	12:36	12:59	14:09	1:10	0,2	0,3	
316	8	131	208	7:54	8:17	9:35	1:18	0,2	0,3	
317	8	131	207	9:25	9:45	11:11	1:26	0,2	0,3	
318	8	131	211	11:08	11:30	12:41	1:11	0,2	0,3	
303	9	133	211	11:17	11:41	12:56	1:15	0,2	0,3	
304	9	112	219	9:58	10:15	11:25	1:10	0,2	0,3	
305	9	112	207	12:44	13:09	14:15	1:06	0,2	0,3	óbito sevoflurano 1,5%
306	9	112	227	8:27	8:56	10:05	1:09	0,2	0,3	
327	10	113	217	10:45	11:06	12:16	1:10	0,2	0,3	
328	10	113	222	12:10	12:29	13:30	1:01	0,2	0,3	
329	10	113	212	9:34	9:50	10:49	0:59	0,2	0,3	
330	10	113	203	7:58	8:25	9:38	1:13	0,2	0,3	

APÊNDICE J Estatísticas dos tempos de operação por grupo experimental.

	G Contr	Grupo Experimental			
		G Isq	G Isq/OTH	G OHB	
Valor de p Shapiro-wilk	0,998	0,022	0,009	0,030	
Graus de liberdade	9	10	10	10	
Mediana	1:09	1:05	1:11	1:10	
Primeiro quartil-terceiro quartil	1:02-1:14	0:59-1:19	1:07-1:15	1:05-1:15	
Média	1:08	1:02	1:13	1:12	
Desvio Padrão	0:07	0:25	0:10	0:12	
Erro padrão	0:02	0:08	0:03	0:04	
95% Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	1:02	0:44	1:05	1:03
	Limite superior	1:14	1:20	1:20	1:21
Mínimo	0:54	0:00	1:03	0:57	
Máximo	1:20	1:35	1:39	1:43	
Intervalo	0:25	1:35	0:36	0:46	

Tempos expressos em hora:minutos

APÊNDICE K - Teste Friedman de amostras pareadas não paramétricas da diferença ponderal medida no sétimo dia e no primeiro dia do experimento, Valor de $p=0,02$.

	N	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	Percentis			Posto Médio
						25o.	50° (Mediana)	75°	
peso em gramas no dia 1 do experimento	36	223,22	13,834	188	253	215,25	220,00	234,00	2,00
peso em gramas no dia 7 do experimento	36	204,61	13,357	174	235	195,25	202,00	214,00	1,00

APÊNDICE L – Controle Ponderal no dia 1 e dia 7 e diferença relativa.

identificação CHIP	caixa	Grupo Experimental	peso dia 1	peso dia 7	% diferença	
963008000803298	1	G Contr	212	óbito		
963008000803310	2	G Contr	253	221	-12,65%	
963008000803294	3	G Contr	207	191	-7,73%	
963008000803314	4	G Contr	218	200	-8,26%	
963008000803302	5	G Contr	220	216	-1,82%	
963008000803322	6	G Contr	209	óbito		
963008000803326	7	G Contr	235	212	-9,79%	
963008000803318	8	G Contr	215	200	-6,98%	
963008000803306	9	G Contr	238	216	-9,24%	
963008000803330	10	G Contr	205	186	-9,27%	
Valor de p Saphiro-Wilk	0,293					
Média	-8,22%					
Desvio Padrão	2,73%					
963008000803297	1	G Isq	214	óbito		
963008000803309	2	G Isq	248	219	-11,69%	
963008000803293	3	G Isq	220	199	-9,55%	
963008000803313	4	G Isq	251	227	-9,56%	
963008000803301	5	G Isq	231	223	-3,46%	
963008000803321	6	G Isq	217	198	-8,76%	
963008000803325	7	G Isq	217	187	-13,82%	fístula
963008000803317	8	G Isq	207	195	-5,80%	fístula
963008000803305	9	G Isq	218	óbito		
963008000803329	10	G Isq	211	193	-8,53%	
Valor de p Saphiro-Wilk	0,875					
Média	-8,90%					
Desvio Padrão	2,83%					
963008000803295	1	G Isq/OTH	241	235	-2,49%	
963008000803307	2	G Isq/OTH	236	214	-9,32%	
963008000803291	3	G Isq/OTH	220	198	-10,00%	
963008000803311	4	G Isq/OTH	220	195	-11,36%	
963008000803299	5	G Isq/OTH	223	214	-4,04%	
963008000803319	6	G Isq/OTH	221	197	-10,86%	
963008000803323	7	G Isq/OTH	212	193	-8,96%	
963008000803315	8	G Isq/OTH	216	203	-6,02%	
963008000803303	9	G Isq/OTH	219	202	-7,76%	
963008000803327	10	G Isq/OTH	215	202	-6,05%	
Valor de p Saphiro-Wilk	0,600					
Média	-7,69%					
Desvio Padrão	2,22%					
963008000803296	1	G OTH	239	222	-7,11%	
963008000803308	2	G OTH	244	213	-12,70%	
963008000803292	3	G OTH	188	174	-7,45%	
963008000803312	4	G OTH	220	198	-10,00%	
963008000803300	5	G OTH	221	213	-3,62%	
963008000803320	6	G OTH	222	196	-11,71%	
963008000803324	7	G OTH	223	206	-7,62%	
963008000803316	8	G OTH	214	185	-13,55%	
963008000803304	9	G OTH	227	210	-7,49%	
963008000803328	10	G OTH	222	213	-4,05%	
Valor de p Saphiro-Wilk	0,460					
Média	-8,53%					
Desvio Padrão	3,19%					

APÊNDICE M - Estatísticas do controle ponderal no primeiro e no sétimo do experimento, peso expresso em gramas.

	Dia 1 do experimento				Dia 7 do Experimento				
	G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH	G Contr	G Isq	Isq/OTH	G OTH	
Valor de p (Saphiro wilk)	0,507	0,173	0,046*	0,116	0,424	0,148	0,035*	0,340	
Média	223,88	225,25	222,30	222,00	205,25	205,13	205,30	203,00	
Desvio padrão	16,651	16,534	9,190	14,996	12,837	15,385	12,650	14,750	
Mediana	219,00	218,50	220,00	222,00	206,00	198,50	202,00	208,00	
Primeiro quartil	209	212,50	215,75	218,50	193,25	193,50	196,50	193,25	
Terceiro quartil	237,25	243,75	226,25	230	216	222	214	213	
Erro padrão	5,887	5,845	2,906	4,742	4,539	5,439	4,000	4,664	
95%									
Intervalo de Confiança para Média	Limite inferior	209,95	211,43	215,73	211,27	194,52	192,26	196,25	192,45
	Limite Superior	237,80	239,07	228,87	232,73	215,98	217,99	214,35	213,55
Variância	277,268	273,357	84,456	224,889	164,786	236,696	160,011	217,556	
Mínimo	205	207	212	188	186	187	193	174	
Máximo	253	251	241	244	221	227	235	222	
Intervalo	48	44	29	56	35	40	42	48	

* distribuição não paramétrica

APÊNDICE N - Evolução clínica por grupo no dia 4 do experimento.

Identificação	Grupo Experimental	num caixa	dia expr	Contração de Pálpebras	Cromodacriorréia	Abaulamento de focinho	Posicionamento de Vibrissas	Posicionamento de Orelhas	Atividade	Flanco	Arqueamento de Dorso	Piloereção	Inchaço abdominal
298	G Contr	1	4	*									
310	G Contr	2	4	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
294	G Contr	3	4	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
314	G Contr	4	4	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
302	G Contr	5	4	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
322	G Contr	6	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
326	G Contr	7	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
318	G Contr	8	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
306	G Contr	9	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
330	G Contr	10	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
297	G Isq	1	4	*									
309	G Isq	2	4	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0
293	G Isq	3	4	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
313	G Isq	4	4	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
301	G Isq	5	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
321	G Isq	6	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
325	G Isq	7	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
317	G Isq	8	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
305	G Isq	9	4	*									
329	G Isq	10	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
295	G Isq/OTH	1	4	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0
307	G Isq/OTH	2	4	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
291	G Isq/OTH	3	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
311	G Isq/OTH	4	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
299	G Isq/OTH	5	4	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
319	G Isq/OTH	6	4	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0
323	G Isq/OTH	7	4	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
315	G Isq/OTH	8	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
303	G Isq/OTH	9	4	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0
327	G Isq/OTH	10	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
296	G OTH	1	4	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0
308	G OTH	2	4	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
292	G OTH	3	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
312	G OTH	4	4	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
300	G OTH	5	4	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
320	G OTH	6	4	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
324	G OTH	7	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
316	G OTH	8	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
304	G OTH	9	4	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
328	G OTH	10	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

*óbito

APÊNDICE O - Evolução clínica por grupo no quinto dia do experimento.

Identificação	Grupo Experimental	num caixa	dia expr	Contração de Pálpebras	Cromodaciorrêia	Abaulamento de focinho	Posicionamento de Vibrissas	Posicionamento de Orelhas	Atividade	Fianco	Arqueamento de Dorso	Piloereção	Inchaço abdominal
298	G Contr	1	5	*	0	0	0	0	1	0	0	0	0
310	G Contr	2	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
294	G Contr	3	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
314	G Contr	4	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
302	G Contr	5	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
322	G Contr	6	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
326	G Contr	7	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
318	G Contr	8	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
306	G Contr	9	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
330	G Contr	10	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
297	G Isq	1	5	*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
309	G Isq	2	5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
293	G Isq	3	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
313	G Isq	4	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
301	G Isq	5	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
321	G Isq	6	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
325	G Isq	7	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
317	G Isq	8	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
305	G Isq	9	5	*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
329	G Isq	10	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
295	G Isq/OTH	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
307	G Isq/OTH	2	5	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
291	G Isq/OTH	3	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
311	G Isq/OTH	4	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
299	G Isq/OTH	5	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
319	G Isq/OTH	6	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
323	G Isq/OTH	7	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
315	G Isq/OTH	8	5	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
303	G Isq/OTH	9	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
327	G Isq/OTH	10	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
296	G OTH	1	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
308	G OTH	2	5	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
292	G OTH	3	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
312	G OTH	4	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
300	G OTH	5	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
320	G OTH	6	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
324	G OTH	7	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
316	G OTH	8	5	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
304	G OTH	9	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
328	G OTH	10	5	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0

*óbito

APÊNDICE P - Evolução clínica por grupo no sexto dia do experimento.

identificação	Grupo Experimental	num caixa	dia expr	Contração de Pálpebras	Cromodacriorréia	Abaulamento de focinho	Posicionamento de Vibrissas	Posicionamento de Orelhas	Atividade	Flanco	Arqueamento de Dorso	Piloereção	Inchaço abdominal
298	G Contr	1	6	*									
310	G Contr	2	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
294	G Contr	3	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
314	G Contr	4	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
302	G Contr	5	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
322	G Contr	6	6	*									
326	G Contr	7	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
318	G Contr	8	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
306	G Contr	9	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
330	G Contr	10	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
297	G Isq	1	6	*									
309	G Isq	2	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
293	G Isq	3	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
313	G Isq	4	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
301	G Isq	5	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
321	G Isq	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
325	G Isq	7	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
317	G Isq	8	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
305	G Isq	9	6	*									
329	G Isq	10	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
295	G Isq/OTH	1	6	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
307	G Isq/OTH	2	6	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
291	G Isq/OTH	3	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
311	G Isq/OTH	4	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
299	G Isq/OTH	5	6	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
319	G Isq/OTH	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
323	G Isq/OTH	7	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
315	G Isq/OTH	8	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
303	G Isq/OTH	9	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
327	G Isq/OTH	10	6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
296	G OTH	1	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
308	G OTH	2	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
292	G OTH	3	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
312	G OTH	4	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
300	G OTH	5	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
320	G OTH	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
324	G OTH	7	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
316	G OTH	8	6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
304	G OTH	9	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
328	G OTH	10	6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0

APÊNDICE Q - Estatísticas dos parâmetros clínicos no quarto dia do experimento.

	cromodaciorrêia				Posição das orelhas				Redução de atividade			
	G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH	G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH	G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH
Valor p Saphiro-wilk	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Graus de liberdade	9	8	10	10	9	8	10	10	9	8	10	10
Média	0,78	0,88	1,10	1,00	0,00	0,00	0,20	0,00	0,33	0,38	0,50	0,60
erro padrão	0,147	0,125	0,100	0,000	0,000	0,000	0,133	0,000	0,167	0,183	0,167	0,163
95% Intervalo de												
Confiança para												
Média												
Desvio padrão	0,441	0,354	0,316	0,000	0,000	0,000	0,422	0,000	0,500	0,518	0,527	0,516
Mínimo	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Máximo	1	1	2	1	0	0	1	0	1	1	1	1
Intervalo	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1
Amplitude interquartil	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1

Lim inf - limite inferior

Lim sup - limite superior

APÊNDICE R - Estatísticas dos parâmetros clínicos no quarto dia do experimento.

	Afundamento dos Flancos				piloereção			
	G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH	G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH
Valor p Saphiro-Wilk	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Graus de liberdade	9	8	10	10	9	8	10	10
Média	0,22	0,13	0,20	0,30	0,00	0,13	0,10	0,10
erro padrão	0,147	0,125	0,133	0,153	0,000	0,125	0,100	0,100
95% Intervalo de								
Confiança para								
Média								
5% da média aparada	0,19	0,08	0,17	0,28	0,00	0,08	0,06	0,06
Mediana	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Variância	0,194	0,125	0,178	0,233	0,000	0,125	0,100	0,100
Desvio padrão	0,441	0,354	0,422	0,483	0,000	0,354	0,316	0,316
Mínimo	0	0	0	0	0	0	0	0
Máximo	1	1	1	1	0	1	1	1
Intervalo	1	1	1	1	0	1	1	1
Amplitude interquartil	1	0	0	1	0	0	0	0

APÊNDICE U- Medição da Força de ruptura em newtons.

Identificação	Gr Exp	Força de ruptura (N)
295	G Isq/OTH	-
307	G Isq/OTH	-
291	G Isq/OTH	0,43
311	G Isq/OTH	0,31
299	G Isq/OTH	0,15
319	G Isq/OTH	0,13
323	G Isq/OTH	0,11
315	G Isq/OTH	0,13
303	G Isq/OTH	0,03
327	G Isq/OTH	0,05
296	G OTH	0,17
308	G OTH	0,03
292	G OTH	1,72
312	G OTH	0
300	G OTH	0,01
320	G OTH	0,01
324	G OTH	0,05
316	G OTH	0,41
304	G OTH	0
328	G OTH	0,01
297	G Isq	0
309	G Isq	0,13
293	G Isq	0,35
313	G Isq	0,01
301	G Isq	0,03
321	G Isq	0,03
325	G Isq	0,01
317	G Isq	0,03
305	G Isq	0,11
329	G Isq	0,19
298	G Contr	0,05
310	G Contr	0,07
294	G Contr	0,13
314	G Contr	0
302	G Contr	0
322	G Contr	-
326	G Contr	0,03
318	G Contr	0
306	G Contr	0,05
330	G Contr	0,03

APÊNDICE V - Frequência absoluta e relativa de animais por escore de Nair por grupo experimental.

Escore de Nair	0	1	2	3	4	-	-
Quantidade de aderências	Ausência	Uma banda	Duas bandas	Três ou Mais bandas	Direta à parede	Fístula na anastomose	Não avaliados
Grupo Exp							
Isq/OTH	0	0	7 (70%)	3 (30%)	0	0	0
OTH	0	0	5 (50%)	5 (50%)	0	0	
Isq	0	0	2 (25%)	6 (75%)	0	2	2
Contr	0	1 (11,11%)	1 (11,11%)	7(77,77%)	0		1

APÊNDICE W - Resultados do estudo histopatológico por animal e por grupo experimental, critérios semiquantitativos avaliados como ausente (0), leve (1), moderado (2) e acentuado (3).

Animal	Grupo Experimental	colágeno	fibroblastos	Infiltrado mononuclear	Infiltrado Polimorfonuclear	hemorragia e congestão	neovascularização	edema
294	G Contr	leve	moderado	leve	moderado	ausente	moderado	leve
302	G Contr	leve	leve	moderado	moderado	leve	moderado	leve
306	G Contr	moderado	moderado	moderado	ausente	ausente	moderado	leve
310	G Contr	leve	moderado	moderado	leve	ausente	moderado	leve
314	G Contr	leve	moderado	leve	acentuado	ausente	moderado	leve
318	G Contr	leve	moderado	moderado	moderado	leve	moderado	leve
322	G Contr	ausente	ausente	moderado	acentuado	moderado	moderado	moderado
326	G Contr	leve	moderado	moderado	acentuado	moderado	moderado	moderado
330	G Contr	leve	moderado	moderado	acentuado	leve	moderado	moderado
293	G Isq	leve	moderado	leve	leve	ausente	moderado	leve
301	G Isq	ausente	leve	moderado	acentuado	leve	moderado	leve
309	G Isq	leve	moderado	moderado	acentuado	ausente	moderado	leve
313	G Isq	leve	moderado	leve	acentuado	leve	moderado	leve
317	G Isq	leve	moderado	moderado	moderado	leve	moderado	leve
321	G Isq	leve	moderado	moderado	acentuado	leve	moderado	leve
325	G Isq	*						
329	G Isq	leve	moderado	moderado	acentuado	leve	moderado	moderado
291	G Isq/OTH	*						
295	G Isq/OTH	ausente	ausente	leve	acentuado	ausente	leve	acentuado
299	G Isq/OTH	ausente	leve	moderado	moderado	leve	leve	leve
303	G Isq/OTH	leve	moderado	moderado	acentuado	leve	moderado	leve
307	G Isq/OTH	leve	moderado	moderado	moderado	ausente	moderado	leve
311	G Isq/OTH	**						
315	G Isq/OTH	leve	moderado	moderado	acentuado	ausente	moderado	leve
319	G Isq/OTH	ausente	leve	moderado	moderado	ausente	leve	leve
323	G Isq/OTH	leve	moderado	moderado	acentuado	leve	moderado	leve
327	G Isq/OTH	leve	moderado	moderado	acentuado	leve	moderado	moderado
292	G OTH	leve	moderado	leve	acentuado	ausente	moderado	leve
296	G OTH	moderado	moderado	moderado	acentuado	leve	moderado	leve
300	G OTH	leve	moderado	leve	moderado	leve	leve	leve
304	G OTH	leve	moderado	moderado	acentuado	leve	moderado	leve
308	G OTH	leve	moderado	moderado	acentuado	ausente	moderado	leve
312	G OTH	leve	moderado	moderado	acentuado	ausente	moderado	leve
316	G OTH	leve	moderado	moderado	acentuado	ausente	moderado	leve
320	G OTH	leve	moderado	moderado	leve	leve	moderado	leve
324	G OTH	**						
328	G OTH	leve	moderado	moderado	acentuado	leve	moderado	moderado

* sem cicatriz, ** sem lâmina

APÊNDICE X – Estatísticas dos parâmetros histológicos por grupo experimental.

		Grupo Experimental			
		G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH
colágeno	Valor p Saphiro-wilk	0,001	0,000	0,000	0,000
	Graus de liberdade	9	7	8	9
	Mediana	1,00	1,00	1,00	1,00
	Amplitude interquartil	0	0	1	0
	Média	1,00	0,86	0,63	1,11
	Erro padrão	0,167	0,143	0,183	0,111
	95% Intervalo de Confiança				
	Limite inferior	0,62	0,51	0,19	0,85
	Limite superior	1,38	1,21	1,06	1,37
	para Média				
	Desvio Padrão	0,500	0,378	0,518	0,333
	Mínimo	0	0	0	1
	Máximo	2	1	1	2
Intervalo	2	1	1	1	
fibroblastos		G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH
	Valor p Saphiro-wilk	0,000	0,000	0,004	
	Graus de liberdade	9	7	8	9
	Mediana	2,00	2,00	2,00	2,00
	Amplitude interquartil	1	0	1	0
	Média	1,67	1,86	1,50	2,00
	Erro padrão	0,236	0,143	0,267	0,000
	95% Intervalo de Confiança				
	Limite inferior	1,12	1,51	0,87	2,00
	Limite superior	2,21	2,21	2,13	2,00
	para Média				
	Desvio Padrão	0,707	0,378	0,756	0,000
	Mínimo	0	1	0	2
Máximo	2	2	2	2	
Intervalo	2	1	2	0	
Infiltrado mononuclear		G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH
	Valor p Saphiro-wilk	0,000	0,000	0,000	0,000
	Graus de liberdade	9	7	8	9
	Mediana	2,00	2,00	2,00	2,00
	Amplitude interquartil	1	1	0	1
	Média	1,78	1,71	1,88	1,78
	Erro padrão	0,147	0,184	0,125	0,147
	95% Intervalo de Confiança				
	Limite inferior	1,44	1,26	1,58	1,44
	Limite superior	2,12	2,17	2,17	2,12
	para Média				
	Desvio Padrão	0,441	0,488	0,354	0,441
	Mínimo	1	1	1	1
Máximo	2	2	2	2	
Intervalo	1	1	1	1	
Infiltrado de polimorfonucleados		G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH
	Valor p Saphiro-wilk	0,039	0,001	0,000	0,000
	Graus de liberdade	9	7	8	9
	Mediana	2,00	3,00	3,00	3,00
	Amplitude interquartil	2	1	1	1
	Média	2,11	2,57	2,63	2,67
	Erro padrão	0,351	0,297	0,183	0,236
	95% Intervalo de Confiança				
	Limite inferior	1,30	1,84	2,19	2,12
	Limite superior	2,92	3,30	3,06	3,21
	para Média				
	Desvio Padrão	1,054	0,787	0,518	0,707
	Mínimo	0	1	2	1
Máximo	3	3	3	3	
Intervalo	3	2	1	2	

continua

APÊNDICE X – Estatísticas dos parâmetros histológicos por grupo experimental -.

		Grupos Experimentais			
		G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH
hemorragia e congestão	Valor p Saphiro-wilk	0,025	0,000	0,001	0,000
	Graus de liberdade	9	7	8	9
	Mediana	1,00	1,00	0,50	1,00
	Amplitude interquartil	2	1	1	1
	Média	0,78	0,71	0,50	0,56
	Erro padrão	0,278	0,184	0,189	0,176
	95% Intervalo de Confiança para Média				
	Limite inferior	0,14	0,26	0,05	0,15
	Limite superior	1,42	1,17	0,95	0,96
	5% da média aparada	0,75	0,74	0,50	0,56
	Variância	0,694	0,238	0,286	0,278
	Desvio Padrão	0,833	0,488	0,535	0,527
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	2	1	1	1
Intervalo	2	1	1	1	
neovascularização	Valor p Saphiro-wilk	G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH
	Graus de liberdade	9	7	8	9
	Mediana	2,00	2,00	2,00	2,00
	Amplitude interquartil	0	0	1	0
	Média	2,00	2,00	1,63	1,89
	Erro padrão	0,000	0,000	0,183	0,111
	95% Intervalo de Confiança para Média				
	Limite inferior	2,00	2,00	1,19	1,63
	Limite superior	2,00	2,00	2,06	2,15
	5% da média aparada	2,00	2,00	1,64	1,93
	Variância	0,000	0,000	0,268	0,111
	Desvio Padrão	0,000	0,000	0,518	0,333
	Mínimo	2	2	1	1
	Máximo	2	2	2	2
Intervalo	0	0	1	1	
edema	Valor p Saphiro-wilk	G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH
	Graus de liberdade	9	7	8	9
	Mediana	1,00	1,00	1,00	1,00
	Amplitude interquartil	1	0	1	0
	Média	1,33	1,14	1,38	1,11
	Erro padrão	0,167	0,143	0,263	0,111
	95% Intervalo de Confiança para Média				
	Limite inferior	0,95	0,79	0,75	0,85
	Limite superior	1,72	1,49	2,00	1,37
	5% da média aparada	1,31	1,10	1,31	1,07
	Variância	0,250	0,143	0,554	0,111
	Desvio Padrão	0,500	0,378	0,744	0,333
	Mínimo	1	1	1	1
	Máximo	2	2	3	2
Intervalo	1	1	2	1	
Reepitelização	Valor p Saphiro-wilk	G Contr	G Isq	G Isq/OTH	G OTH
	Graus de liberdade	9	7	8	9
	Mediana	1,00	1,00	0,00	1,00
	Amplitude interquartil	2	1	1	1
	Média	0,78	0,57	0,25	0,67
	Erro Padrão	0,278	0,202	0,164	0,167
	95% Intervalo de Confiança para Média				
	Limite inferior	0,14	0,08	-0,14	0,28
	Limite superior	1,42	1,07	0,64	1,05
	5% da média aparada	0,75	0,58	0,22	0,69
	Variância	0,694	0,286	0,214	0,250
	Desvio Padrão	0,833	0,535	0,463	0,500
	Mínimo	0	0	0	0
	Máximo	2	1	1	1
Intervalo	2	1	1	1	

conclusão

APÊNDICE Y - Resultados de coeficientes de correlação tau de Kendall bivariável para parâmetros.

		Colágeno	fibroblastos	Infiltrado de mononucleares	polimorfonucleados	hemorragia e congestão	neovascularização	edema	Reepitelização	ulceração	necrose isquêmica	microabscesso	colônias	corpo estranho	crosta fibrinoleucocitária
Fibro	T_b	,769**													
	P	0,000													
Monoc	T_b	0,053	-0,028												
	p	0,757	0,870												
Polimorfo	T_b	-0,081	0,041	0,061											
	p	0,626	0,806	0,718											
Hemor	T_b	-0,092	-0,133	0,304	0,187										
	p	0,587	0,432	0,078	0,257										
Neovasc	T_b	,543**	,534**	0,262	0,214	0,075									
	p	0,002	0,002	0,139	0,207	0,663									
edema	T_b	-0,242	-0,207	0,054	,362*	,358*	-0,074								
	P	0,157	0,227	0,757	0,031	0,036	0,670								
Reepit	T_b	,498**	,450**	-0,021	-0,255	0,050	0,198	0,130							
	p	0,003	0,008	0,902	0,124	0,767	0,252	0,445							
ulcera	T_b	-0,281	-0,146	-0,164	0,299	,347*	-0,117	0,161	-0,273						
	p	0,104	0,401	0,353	0,078	0,044	0,506	0,355	0,114						
necros	T_b	-0,287	-0,285	0,013	0,299	0,234	-0,102	,419*	-0,263	0,134					
	p	0,098	0,100	0,943	0,077	0,174	0,564	0,016	0,128	0,450					
McrAbsc	T_b	-0,262	-0,063	-0,088	,731**	0,171	-0,193	0,265	-0,299	,352*	0,219				
	p	0,130	0,718	0,619	0,000	0,321	0,276	0,129	0,083	0,047	0,215				
côlon	T_b	-0,074	-0,014	0,207	0,168	,480**	-0,197	,354*	-0,084	0,307	0,266	,355*			
	p	0,667	0,936	0,242	0,321	0,005	0,265	0,043	0,627	0,083	0,132	0,045			
Corp	T_b	0,068	0,146	0,164	0,044	0,219	0,117	0,085	-0,121	0,100	0,160	0,164	0,326		
	p	0,692	0,401	0,353	0,797	0,204	0,506	0,628	0,482	0,572	0,364	0,353	0,065		
crosta	T_b	-0,268	-0,171	0,262	,356*	,407*	-0,138	0,190	-,481**	,528**	0,157	0,262	,360*	0,117	
	p	0,122	0,324	0,139	0,036	0,018	0,435	0,277	0,005	0,003	0,375	0,139	0,042	0,506	
Sep	T_b	-,455**	-,446*	-0,207	-0,036	-0,088	-,360*	-0,071	-,684**	0,115	0,241	0,090	-0,029	0,096	,383*
	p	0,009	0,010	0,242	0,833	0,612	0,042	0,685	0,000	0,515	0,173	0,611	0,868	0,588	0,030

* A correlação é significativa no nível 0,05 (2 extremidades).

** A correlação é significativa no nível 0,01 (2 extremidades).

p = Valor de p bicaudal

T_b = Coeficiente de Correlação tau de Kendall

Fibro= fibroblastos, Monoc= infiltrado mononuclear, Polimorfo= infiltrado Polimorfonuclear, Hemor=Hemorragia e congestão, Neovasc=Neovascularização, edema, Reepit=reepitelização, ulcera=ulceração, necros=necrose isquêmica, McrAbsc=Microabscesso, côlon=colônias bacterianas, Corp=corpo estranho, crosta =crosta fibrinoleucocitária, Sep=separação dos bordos da ferida da operação

APÊNDICE Z - Resultados do estudo histopatológico por animal e por grupo experimental, critérios semiquantitativos avaliados como presente ou ausente.

	Grupo Experimental	Reepitelização	ulceração	Necrose isquêmica	microabscesso	colônias	corpo estranho	Crosta	Separação das Bordas da Ferida da operação
294	G Contr	PARCIAL	P	A	P	A	A	A	A
302	G Contr	AUSENTE	P	A	A	A	A	P	P
306	G Contr	TOTAL	A	A	A	A	A	A	A
310	G Contr	TOTAL	A	A	A	A	A	A	A
314	G Contr	AUSENTE	P	A	P	P	A	P	P
318	G Contr	AUSENTE	P	A	P	P	P	P	P
322	G Contr	AUSENTE	P	P	P	P	A	P	P
326	G Contr	PARCIAL	P	A	P	P	A	P	A
330	G Contr	PARCIAL	P	A	P	P	A	P	A
293	G Isq	PARCIAL	P	A	A	A	A	P	P
301	G Isq	AUSENTE	P	A	P	A	A	P	P
309	G Isq	AUSENTE	P	A	P	A	A	P	P
313	G Isq	AUSENTE	P	A	P	A	A	P	P
317	G Isq	PARCIAL	P	A	A	P	A	P	A
321	G Isq	PARCIAL	P	A	P	A	A	P	A
325	G Isq	*							
329	G Isq	PARCIAL	P	A	P	P	A	P	A
291	G Isq/OTH	*							
295	G Isq/OTH	AUSENTE	P	P	P	A	A	P	P
299	G Isq/OTH	AUSENTE	P	A	P	P	A	P	P
303	G Isq/OTH	AUSENTE	P	P	P	P	P	P	P
307	G Isq/OTH	AUSENTE	P	A	A	A	A	P	P
311	G Isq/OTH	**							
315	G Isq/OTH	AUSENTE	P	A	P	P	A	P	A
319	G Isq/OTH	AUSENTE	P	A	P	P	A	P	P
323	G Isq/OTH	PARCIAL	P	A	P	A	A	P	A
327	G Isq/OTH	PARCIAL	P	A	P	P	P	P	A
292	G OTH	PARCIAL	P	A	P	A	A	A	A
296	G OTH	PARCIAL	P	A	P	P	A	P	A
300	G OTH	PARCIAL	P	A	P	P	A	P	P
304	G OTH	AUSENTE	P	P	P	P	A	P	A
308	G OTH	AUSENTE	P	A	P	A	A	P	P
312	G OTH	AUSENTE	A	A	P	A	A	P	P
316	G OTH	PARCIAL	P	A	P	A	A	P	A
320	G OTH	PARCIAL	P	A	A	A	A	P	A
324	G OTH	**							
328	G OTH	PARCIAL	P	P	P	P	A	P	P

* sem cicatriz, ** sem lâmina

APÊNDICE AA - Resultados do estudo histopatológico por animal e por grupo experimental, critérios semiquantitativos avaliados como ausente (0), parcial(1) ou total (2).

	Grupo Experimental	Reepitelização
294	G Contr	PARCIAL
302	G Contr	AUSENTE
306	G Contr	TOTAL
310	G Contr	TOTAL
314	G Contr	AUSENTE
318	G Contr	AUSENTE
322	G Contr	AUSENTE
326	G Contr	PARCIAL
330	G Contr	PARCIAL
293	G Isq	PARCIAL
301	G Isq	AUSENTE
309	G Isq	AUSENTE
313	G Isq	AUSENTE
317	G Isq	PARCIAL
321	G Isq	PARCIAL
325	G Isq	
329	G Isq	PARCIAL
291	G Isq/OTH	
295	G Isq/OTH	AUSENTE
299	G Isq/OTH	AUSENTE
303	G Isq/OTH	AUSENTE
307	G Isq/OTH	AUSENTE
311	G Isq/OTH	
315	G Isq/OTH	AUSENTE
319	G Isq/OTH	AUSENTE
323	G Isq/OTH	PARCIAL
327	G Isq/OTH	PARCIAL
292	G OTH	PARCIAL
296	G OTH	PARCIAL
300	G OTH	PARCIAL
304	G OTH	AUSENTE
308	G OTH	AUSENTE
312	G OTH	AUSENTE
316	G OTH	PARCIAL
320	G OTH	PARCIAL
324	G OTH	
328	G OTH	PARCIAL

APÊNDICE BB - Estudo Histopatológico critério reepitelização, frequência relativa por classificação e por grupo.

Grupos experimentais	AUSENTE	PARCIAL	TOTAL	Total Geral
G Contr	44%	34%	22%	100%
G Isq	43%	57%	0%	100%
G Isq/OTH	75%	25%	0%	100%
G OTH	33%	67%	0%	100%

APÊNDICE CC - Declaração de conflito de interesses

Os autores afirmam que não houve conflito de interesses financeiros ou de outra natureza na realização da pesquisa nem na redação desta dissertação. O estudo não recebeu apoio financeiro de nenhum laboratório ou empresa farmacêutica.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação no comitê de ética de uso animal

Aditamento DTEP nº 07 ao BI nº 160, de 19 de agosto de 2016.

a- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP

- Sem alteração

b- COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

- Realização de Pesquisa - Autorização

Foi autorizado pela Direção Técnica de Ensino e Pesquisa do HFA e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA/HFA) o seguinte projeto de pesquisa:

1- Projeto de Pesquisa a ser apresentado ao Programa de Pós-Graduação UnB como requisito parcial para obtenção de título de Mestre. Área de Concentração: Cirurgia Experimental. Título do projeto: Efeito da oxigenoterapia hiperbárica na resistência de anastomoses de colón normais e isquêmicas em ratos. Pesquisador: Cap. QCO Vet José Luiz Fontoura de Andrade (SEI: 60550.008623/2016-00)

- Realização de Treinamento - Autorização

Foram autorizados pela Direção Técnica de Ensino e Pesquisa do HFA e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA/HFA) os seguintes projetos de treinamento:

1-Projeto Piloto para treinamento de técnicas cirúrgicas e laparotomias na área de cirurgia geral. Proponente Principal: Dr. Wendel dos Santos Furtado (SEI: 60550.010952/2016-11)

2-Projeto Piloto para treinamento da anastomose de vasos e neurorrafia em microcirurgia. Proponentes Principais Capitão-de-Corveta Med Cláudio Rodrigues de Lima e Dr. Leandro Pretto Flores (SEI: 60550.010341/2016-64)

3-Projeto Piloto para treinamento cirúrgico em articulação temporomandibular (ATM) em peça anatômica modelo cabeça de suínos. Proponente Principal: 1º Ten ODT Danilo Ibrahim (SEI: 60550.013229/2016-85)

TERCEIRA PARTE – ASSUNTOS GERAIS E ADMINISTRATIVOS

(Sem alteração)

QUARTA PARTE – JUSTIÇA E DISCIPLINA

(Sem alteração)

Gen Div LAURO LUÍS PIRES DA SILVA
Comandante Logístico do Hospital das Forças Armadas



ANEXO B - Credenciamento Laboratório de Cirurgia Experimental do HFA no Conselho nacional de Controle de Experimentação animal publicado no pag 4 da Seção 1 do DOU nº 131 de 11 de julho de 2014.



4

ISSN 1677-7042

Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

EXTRATO DE PARECER Nº 123/2014

O Coordenador do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA, no uso de suas atribuições e de acordo com o art. 5º, inc. II, da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, arts. 34 e 35 do Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e na Resolução Normativa nº 16, de 30 de Abril de 2014, torna público que o CONCEA apreciou e emitiu Parecer Técnico para o seguinte pedido de credenciamento:

Processo nº.: 01200.002195/2013-61(156)

CNPJ: 03.568.867/0001-36 - MATRIZ

Razão Social: Hospital das Forças Armadas

Nome da Instituição: Hospital das Forças Armadas

Endereço da Instituição: Estrada Contorno do Bosque, S/N, SHC/SUL, Cruzeiro Novo, Brasília-DF, CEP 70.658-900.

Modalidade de solicitação: requerimento de credenciamento da instituição.

Decisão: DEFERIDO

CIAEP: 01.0198.2014

O CONCEA, após análise do pedido de credenciamento da instituição, concluiu pelo DEFERIMENTO, conforme o Parecer nº. 123/2014- CONCEA/MCTI.

A instituição apresentou todos os documentos conforme disposto na Resolução Normativa nº 16, de 30 de Abril de 2014, além de comprovar constituição de CEUA nos termos do art. 8º da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008.

O CONCEA esclarece que este extrato não exime a requerente do cumprimento das demais legislações vigentes no país e das normas estabelecidas pelo CONCEA, aplicáveis ao objeto do requerimento.

JOSÉ MAURO GRANJEIRO

ANEXO C - Certificado de monitoramento de saúde animal de acordo com recomendações internacionais



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
 Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório – CEMIB
 ICLAS LABORATORY NETWORK MEMBER FOR IMPROVING ANIMAL QUALITY IN RESEARCH
<http://www.cemib.unicamp.br>

Capitão José Luiz Fontoura de Andrade
 Hospital das Forças Armadas
 Brasília-DF

Certificado de Monitoramento da Saúde Animal

Espécie: Rato
 Linhagem: LEW/Hsd Unib
 Área: Produção
 Data últimos testes de monitoramento: Maio/2017

O programa de monitoramento sanitário do CEMIB/UNICAMP é realizado de acordo com as recomendações internacionais da FELASA (*Federation of Laboratory Animal Science Associations*). Neste programa, certificamos a ausência de agentes patogênicos, secundários e oportunistas que acometem camundongos, assim como agentes infecciosos que podem causar riscos à saúde humana.

Segue abaixo relacionados os agentes isentos nesta linhagem.

1 - **Ecto e Endoparasitas:** *Radfordia ensifera*, *Poliplax spinulosa*, *Poliplax serrata*, *Syphacia muris*, *Aspicularis tetraoptera*, *Hymenolepis nana*, *Hymenolepis diminuta*, *Spironucleus muris*, *Giardia muris*, *Entamoeba muris*, *Tritrichomonas muris*, *Tritrichomonas minuta*, *Hexamastix muris*, *Chilomastix bittencourt*, *Eimeria sp*, *Cryptosporidium parvum*, e *Cryptosporidium muris*.

2 - **Bactérias e fungos:** *Mycoplasma pulmonis*, *Shigella sp*, *Citrobacter rodentium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus β-hemolítico grupo A, B, C e G*, *Corynebacterium kutscheri*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp (α-hemolítico)*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pasteurella pneumotropica*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Clostridium piliforme*, *Helicobacter sp* e *Pneumocystis carinii*.

3 - **Vírus:** Coronavírus do rato (RCV/SDAV -Vírus da Sialodacrioadenite), Rat Theilovirus (RTV), Norovírus murinho, Sendai vírus, Reovírus tipo 3, Adenovírus tipo 1 (cepa FL), Adenovírus tipo 2 (cepa K87) Rotavírus grupo A (Edim), vírus da pneumonia do camundongo (PVM), Parvovírus murino (Rat Parvovirus – RPV; Rat Minute Virus -RMV; Killhan rat – KRV; Toolan H-1).

Campinas, 22 de junho de 2017.

Dr. Luiz Augusto Corrêa Passos
 Diretor - CEMIB/UNICAMP
 E-mail : dirbio@unicamp.br

Dra. Daniele Masselli Rodrigues Demolin
 Diretora Associada
 E-mail: danimaro@unicamp.br

Méd. Vet. Clárcia Yukari Minagawa Issei
 Responsável Técnica
 E-mail: minagawa@unicamp.br

ANEXO D - Atestado de saúde animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
 Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
 na Área da Ciência em Animais de Laboratório – CEMIB
<http://www.cemib.unicamp.br>

Cap. JOSÉ LUIZ FONTOURA DE ANDRADE
 CPF 613.370.720-87
 CNPJ 03.568.867/0001-36
 HOSPITAL DAS FORÇAS ARMADAS
 BRASILIA - DF

Atestado de Saúde Animal Nº 166/2017

Atestamos que os Ratos (16 Fêmeas) da linhagem **LEW/HsdUnib**, provenientes da Divisão de Produção de Animais S.P.F. (Specific Pathogen Free) deste Centro, pertencem à categoria sanitária S.P.F. e apresentam-se isentos dos agentes patogênicos pesquisados pelo laboratório de controle de qualidade sanitária. Informamos que os mesmos encontram-se livres de outros agentes infecciosos capazes de causarem riscos à saúde humana. A validade deste Atestado consta da data dos últimos testes do programa de monitorização sanitária, rotineiramente realizados pelo Laboratório de Controle de Qualidade Animal - C.Q.S.(*).

Observação - O estado sanitário dos animais retirados do CEMIB nesta data será mantido se os mesmos forem acondicionados em equipamento adequado e o mesmo não for violado durante o transporte. A Instituição receptora deverá oferecer infra-estrutura e condições adequadas para a manutenção de animais da Categoria Sanitária livres de agentes patogênicos especificados (S.P.F.), alojando os animais em equipamentos e/ou salas dotadas de sistema de barreiras de proteção sanitária. Torna-se necessário manejo correto e a esterilização de todo material utilizado na rotina como: ração, maravalha/cama, bebedouros, água, galolas, tampas, e outros.

(*) Data dos últimos testes de monitorização sanitária realizados em Abril de 2017.

Campinas, 15 de maio de 2017.

Prof. Dr. Luiz Augusto Correa Passos
 Diretor do Centro Multidisciplinar para
 Investigação Biológica
 CEMIB/UNICAMP
 E-mail: diretoria@cemib.unicamp.br

Dr. Michel Vaz de Oliveira
 CRMV-SP 16353 - Médico Veterinário
 E-mail: michelvaz@gmail.com

ANEXO E - Atestado de saúde animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
 Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
 na Área da Ciência em Animais de Laboratório – CEMIB
<http://www.cemib.unicamp.br>

Cap. JOSÉ LUIZ FONTOURA DE ANDRADE
 CPF 613.370.720-87
 CNPJ 03.568.867/0001-36
 HOSPITAL DAS FORÇAS ARMADAS
 BRASILIA - DF

Atestado de Saúde Animal Nº 177/2017

Atestamos que os Ratos (17 Fêmeas) da linhagem **LEW/HsdUnib**, provenientes da Divisão de Produção de Animais S.P.F. (Specific Pathogen Free) deste Centro, pertencem à categoria sanitária S.P.F. e apresentam-se isentos dos agentes patogênicos pesquisados pelo laboratório de controle de qualidade sanitária. Informamos que os mesmos encontram-se livres de outros agentes infecciosos capazes de causarem riscos à saúde humana. A validade deste Atestado consta da data dos últimos testes do programa de monitorização sanitária, rotineiramente realizados pelo Laboratório de Controle de Qualidade Animal - C.Q.S.(*)

Observação - O estado sanitário dos animais retirados do CEMIB nesta data será mantido se os mesmos forem acondicionados em equipamento adequado e o mesmo não for violado durante o transporte. A Instituição receptora deverá oferecer infra-estrutura e condições adequadas para a manutenção de animais da Categoria Sanitária livres de agentes patogênicos especificados (S.P.F.), alojando os animais em equipamentos e/ou salas dotadas de sistema de barreiras de proteção sanitária. Torna-se necessário manejo correto e a esterilização de todo material utilizado na rotina como: ração, maravalha/cama, bebedouros, água, galolas, tampas, e outros.

(*) Data dos últimos testes de monitorização sanitária realizados em Abril de 2017.

Campinas, 22 de maio de 2017.

Prof. Dr. Luiz Augusto Correa Passos
 Diretor do Centro Multidisciplinar para
 Investigação Biológica
 CEMIB/UNICAMP
 E-mail: diretoria@cemib.unicamp.br

Dr. Michel Vaz de Oliveira
 CRMV-SP 18353 - Médico Veterinário
 E-mail: michelvaz@gmail.com

ANEXO F - Atestado de saúde animal



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
 Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
 na Área da Ciência em Animais de Laboratório – CEMIB
<http://www.cemib.unicamp.br>

Cap. JOSÉ LUIZ FONTOURA DE ANDRADE
 CPF 613.370.720-87
 CNPJ 03.568.867/0001-36
 HOSPITAL DAS FORÇAS ARMADAS
 BRASÍLIA - DF

Atestado de Saúde Animal Nº 190/2017

Atestamos que os Ratos (07 Fêmeas) da linhagem **LEW/HsdUnib**, provenientes da Divisão de Produção de Animais S.P.F. (Specific Pathogen Free) deste Centro, pertencem à categoria sanitária S.P.F. e apresentam-se isentos dos agentes patogênicos pesquisados pelo laboratório de controle de qualidade sanitária. Informamos que os mesmos encontram-se livres de outros agentes infecciosos capazes de causarem riscos à saúde humana. A validade deste Atestado consta da data dos últimos testes do programa de monitorização sanitária, rotineiramente realizados pelo Laboratório de Controle de Qualidade Animal - C.Q.S. (*).

Observação - O estado sanitário dos animais retirados do CEMIB nesta data será mantido se os mesmos forem acondicionados em equipamento adequado e o mesmo não for violado durante o transporte. A instituição receptora deverá oferecer infra-estrutura e condições adequadas para a manutenção de animais da Categoria Sanitária livres de agentes patogênicos especificados (S.P.F.), alojando os animais em equipamentos e/ou salas dotadas de sistema de barreiras de proteção sanitária. Torna-se necessário manejo correto e a esterilização de todo material utilizado na rotina como: ração, maravalha/cama, bebedouros, água, gaiolas, tampas, e outros.




(*) Data dos últimos testes de monitorização sanitária realizados em Maio de 2017.

Campinas, 06 de Junho de 2017.

Prof. Dr. Luiz Augusto Correa Passos
 Diretor do Centro Multidisciplinar para
 Investigação Biológica
 CEMIB/UNICAMP
 E-mail: diretoria@cemib.unicamp.br







Dr. Michel Vaz de Oliveira
 CRMV-SP: 16353 - Médico Veterinário
 E-mail: michelvaz@gmail.com

ANEXO G - Guia de trânsito animal

REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DEPARTAMENTO DE SAÚDE ANIMAL		GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA		DEFESA AGROPECUÁRIA																							
GUIA DE TRÂNSITO ANIMAL (GTA) (Válida em todo o território nacional)				UF SP	SÉRIE I																						
				NÚMERO 989698																							
1. BOVIDEOS <input type="checkbox"/> Bovinos <input type="checkbox"/> Bubalinos			2. MARCA DO REBANHO																								
<table border="1"> <tr> <td colspan="2">até 12 meses</td> <td colspan="2">13 a 24 meses</td> <td colspan="2">25 a 36 meses</td> <td colspan="2">+ de 36 meses</td> <td colspan="2">Total</td> </tr> <tr> <td>M</td><td>F</td><td>M</td><td>F</td><td>M</td><td>F</td><td>M</td><td>F</td><td>M</td><td>F</td> </tr> </table>			até 12 meses		13 a 24 meses		25 a 36 meses		+ de 36 meses		Total		M	F	M	F	M	F	M	F	M	F					
até 12 meses		13 a 24 meses		25 a 36 meses		+ de 36 meses		Total																			
M	F	M	F	M	F	M	F	M	F																		
3. AVES <input type="checkbox"/> Galinhas <input type="checkbox"/> Ovos: Fêmeas <input type="checkbox"/> Beldugas <input type="checkbox"/> Corte <input type="checkbox"/> Macho <input type="checkbox"/> Fêmea <input type="checkbox"/> Total <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Perus <input type="checkbox"/> Perdas de 1 dia <input type="checkbox"/> Avós <input type="checkbox"/> Postura <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Avestruzes <input type="checkbox"/> Adultos <input type="checkbox"/> Matrizes <input type="checkbox"/> Comercial <input type="checkbox"/>																											
4. SUÍDEOS <input type="checkbox"/>		5. ANIMAIS DE LABORATÓRIO <input checked="" type="checkbox"/>		6. CAPRINOS <input type="checkbox"/>																							
<table border="1"> <tr> <td>Macho</td><td>Fêmea</td><td>Ambo</td><td>Total</td><td>Peso (KG)</td><td>Unidades</td> </tr> <tr> <td>0</td><td>0</td><td>16</td><td>16</td><td>X</td><td></td> </tr> </table>		Macho	Fêmea	Ambo	Total	Peso (KG)	Unidades	0	0	16	16	X		<table border="1"> <tr> <td colspan="2">Até 12 meses</td> <td colspan="2">Acima de 12</td> <td>Total</td> </tr> <tr> <td>M</td><td>F</td><td>M</td><td>F</td><td></td> </tr> </table>		Até 12 meses		Acima de 12		Total	M	F	M	F		7. OVINOS <input type="checkbox"/>	
Macho	Fêmea	Ambo	Total	Peso (KG)	Unidades																						
0	0	16	16	X																							
Até 12 meses		Acima de 12		Total																							
M	F	M	F																								
8. EQUÍDEOS <input type="checkbox"/>		9. ANIMAIS AQUÁTICOS																									
<input type="checkbox"/> Equinos <input type="checkbox"/> Asininos <input type="checkbox"/> Mulsos		<table border="1"> <tr> <td><input type="checkbox"/> Peixes</td><td><input type="checkbox"/> Adultos</td><td><input type="checkbox"/> Ovos Embrionados</td><td><input type="checkbox"/> Peso (KG)</td><td rowspan="4">Total</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Crustáceos</td><td><input type="checkbox"/> Alvíolos</td><td><input type="checkbox"/> Cistos</td><td><input type="checkbox"/> Volumes (m.)</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Moluscos</td><td><input type="checkbox"/> Larvas</td><td><input type="checkbox"/> Indeterminado</td><td><input type="checkbox"/> Unidades</td> </tr> <tr> <td><input type="checkbox"/> Outros</td><td><input type="checkbox"/> Pós-larvas</td><td></td><td></td> </tr> </table>				<input type="checkbox"/> Peixes	<input type="checkbox"/> Adultos	<input type="checkbox"/> Ovos Embrionados	<input type="checkbox"/> Peso (KG)	Total	<input type="checkbox"/> Crustáceos	<input type="checkbox"/> Alvíolos	<input type="checkbox"/> Cistos	<input type="checkbox"/> Volumes (m.)	<input type="checkbox"/> Moluscos	<input type="checkbox"/> Larvas	<input type="checkbox"/> Indeterminado	<input type="checkbox"/> Unidades	<input type="checkbox"/> Outros	<input type="checkbox"/> Pós-larvas							
<input type="checkbox"/> Peixes	<input type="checkbox"/> Adultos	<input type="checkbox"/> Ovos Embrionados	<input type="checkbox"/> Peso (KG)	Total																							
<input type="checkbox"/> Crustáceos	<input type="checkbox"/> Alvíolos	<input type="checkbox"/> Cistos	<input type="checkbox"/> Volumes (m.)																								
<input type="checkbox"/> Moluscos	<input type="checkbox"/> Larvas	<input type="checkbox"/> Indeterminado	<input type="checkbox"/> Unidades																								
<input type="checkbox"/> Outros	<input type="checkbox"/> Pós-larvas																										
10. TOTAL POR EXTENSO dezesseis unidades de animais de laboratório																											
11. PROCEDÊNCIA CPF/CNPJ: 46069425000133 S 22°49'27.700" O 47°3'35.600" Nome: Universidade Estadual de Campinas Estabelecimento: Centro Multidisciplinar para Investigação Código do Estabelecimento: 35095020847 (AP:0001) Município: Campinas UF: SP			12. DESTINO CPF/CNPJ: 81337072087 S 00°00'00.0" W 00°00'00.0" Nome: JOSÉ LUIZ FONTOURA DE ANDRADE Estabelecimento: HOSPITAL DAS FORÇAS ARMADAS Código do Estabelecimento: Município: Brasília UF: DF																								
13. <input type="checkbox"/> Abate <input type="checkbox"/> Engorda <input type="checkbox"/> Reprodução <input type="checkbox"/> Exposição <input type="checkbox"/> Leilão <input type="checkbox"/> Esporte <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa																											
14. MEIOS DE TRANSPORTE <input type="checkbox"/> A pé <input checked="" type="checkbox"/> Rodoviário <input type="checkbox"/> Ferroviário <input checked="" type="checkbox"/> Aéreo <input type="checkbox"/> Marítimo/Fluvial Lacre nº																											
15. VACINAÇÕES																											
16. ATESTADO DE EXAMES <input checked="" type="checkbox"/> Atestado Sanitário Nº 1802017																											
17. OBSERVAÇÃO ATESTADO DE SAÚDE EM ANEXO - CFMB/UNICAMP Ratos (16 Fêmeas) de linhagem LEW11edUnib				18. UNIDADE EXPEDIDORA EDA de Campinas Tel: (19) 3045-3474 Email: edecampinas@eda.sp.gov.br Município: Campinas																							
Nota Fiscal: DARE: 170590269722908				19. IDENTIFICAÇÃO E ASSINATURA DO EMITENTE  Michel Vaz de Oliveira Médico Veterinário Habilitado Nº 601-SP CRMV Nº 16353 - SP																							
19. EMITENTE: Médico Veterinário <input type="checkbox"/> Federal <input type="checkbox"/> Estadual <input checked="" type="checkbox"/> Habilitado <input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Funcionário Autorizado <input type="checkbox"/> Emissão Eletrônica		20. EMISSÃO Local: Campinas SP Data: 15/05/2017 Hora: 14:33 Validade: 19/05/2017 Fone: 19 3045-3474																									
<p><small>Formulário em conformidade com as normas de acesso com: Decreto nº 1.741, de 30 de março de 2006; Instrução Normativa nº 13, de 03 de maio de 2011; Resolução SAA nº 19 e RJ de 19 de dezembro de 2010.</small></p>																											
		 3509 9896 9851 5052 0170 8000 0016 0095 0208 4700 1086																									

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

ANEXO H - Guia de trânsito animal

 REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO SECRETARIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DEPARTAMENTO DE SAÚDE ANIMAL		 GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO COORDENADORIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA		 DEFESA AGROPECUÁRIA	
GUIA DE TRÂNSITO ANIMAL (GTA) (Válida em todo o território nacional)				UF SP	SÉRIE J
				NÚMERO 004460	
1. BOVIDEOS <input type="checkbox"/> Bovinos <input type="checkbox"/> Bubalinos Até 12 meses: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> 13 a 24 meses: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> 25 a 36 meses: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> + de 36 meses: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> Total: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>				2. MARCA DO REBANHO	
3. AVES <input type="checkbox"/> Galinhas <input type="checkbox"/> Ovos Férteis <input type="checkbox"/> Bisavós <input type="checkbox"/> Corte <input type="checkbox"/> Macho <input type="checkbox"/> Fêmeas <input type="checkbox"/> Total <input type="checkbox"/> Perua <input type="checkbox"/> Pintos de 1 dia <input type="checkbox"/> Avós <input type="checkbox"/> Pastora <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Avestruços <input type="checkbox"/> Adultos <input type="checkbox"/> Matrizes Comerciais					
4. SUIDEOS <input type="checkbox"/>		5. ANIMAIS DE LABORATÓRIO <input checked="" type="checkbox"/>		6. CAPRINOS <input type="checkbox"/>	
Macho <input type="checkbox"/> Fêmeas <input type="checkbox"/> Ambos <input type="checkbox"/> Total <input type="checkbox"/> 0 0 17 17		Peso (KG) <input checked="" type="checkbox"/> Unidades <input type="checkbox"/>		7. OVINOS <input type="checkbox"/> 8. EQUÍDEOS <input type="checkbox"/> Até 12 meses: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> Acima de 12: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> Total <input type="checkbox"/> Equínos <input type="checkbox"/> Asíninos <input type="checkbox"/> Múenes <input type="checkbox"/>	
9. ANIMAIS AQUÁTICOS				9. ANIMAIS AQUÁTICOS <input type="checkbox"/> Peixes <input type="checkbox"/> Adultos <input type="checkbox"/> Ovos Embrionários <input type="checkbox"/> Peso (KG) <input type="checkbox"/> Total <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Crustáceos <input type="checkbox"/> Alavancas <input type="checkbox"/> Cistos <input type="checkbox"/> Volumes (n.) <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Moluscos <input type="checkbox"/> Larvas <input type="checkbox"/> Indeterminada <input type="checkbox"/> Unidades <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> Outros <input type="checkbox"/> Pós-larvas <input type="checkbox"/>	
10. TOTAL POR EXTENSO dezesete unidades de animais de laboratório					
11. PROCEDÊNCIA S 22°49'27.700" O 47°3'35.600" CPF/CNPJ: 46068425000133 Nome: Universidade Estadual de Campinas Estabelecimento: Centro Multidisciplinar para Investigação Código do Estabelecimento: 35095020847 (AP.0001) Município: Campinas UF: SP			12. DESTINO S 00°00'00.0" W 00°00'00.0" CPF/CNPJ: 61337072067 Nome: JOSÉ LUIZ FONTOURA DE ANDRADE Estabelecimento: HOSPITAL DAS FORÇAS ARMADAS Código do Estabelecimento: Município: Brasília UF: DF		
13. <input type="checkbox"/> Abate <input type="checkbox"/> Engorda <input type="checkbox"/> Reprodução <input type="checkbox"/> Exposição <input type="checkbox"/> Leite <input type="checkbox"/> Exporte <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa					
14. MEIOS DE TRANSPORTE <input type="checkbox"/> A pé <input checked="" type="checkbox"/> Rodoviário <input type="checkbox"/> Ferroviário <input checked="" type="checkbox"/> Aéreo <input type="checkbox"/> Marítimo/Fluvial <input type="checkbox"/> Lacre nº					
15. VACINAÇÕES					
16. ATESTADO DE EXAMES <input checked="" type="checkbox"/> Atestado Sanitário Nº 1772017					
17. OBSERVAÇÃO - ATESTADO DE SAÚDE EM ANEXO - CENBLUNICAMP Ratos (17 Fêmeas) da Integem LEW/Hst/Unib,.				18. UNIDADE EXPEDIDORA EDA de Campinas Tel: (19) 3045-3474 Email: edacampinas@cda.sp.gov.br Município: Campinas	
Nota Fiscal: DARE: 170590261576564				21. IDENTIFICAÇÃO E ASSINATURA DO EMITENTE  Michel Vaz de Oliveira Médico Veterinário Habilitado Nº 601-SP CRMV Nº 16353 - SP	
19. EMITENTE: Médico Veterinário <input type="checkbox"/> Federal <input type="checkbox"/> Estadual <input checked="" type="checkbox"/> Habilitado <input type="checkbox"/> Funcionário Autorizado <input type="checkbox"/> Emissão Eletrônica		20. EMISSÃO Local: Campinas SP Data: 22/05/2017 Hora: 15:38 Validade: 26/05/2017 Fone: 19 3045-3474			
(Governante para trânsito de animais de acordo com: Decreto nº 3.141, de 30 de março de 2006; Instrução Normativa nº 16, de 03 de maio de 2011; Resoluções SAA nº 16 e 60 de 18 de dezembro de 2012.)					
					
3510 0044 6062 2052 0170 8000 0017 9095 0208 4700 1081					

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO

ANEXO I - Guia de Trânsito Animal

		DEFESA AGROPECUÁRIA	
GUIA DE TRÂNSITO ANIMAL (GTA) (Válida em todo o território nacional)		UF: SP	SERIE: J
1. BOVIDOS: <input type="checkbox"/> Bovinos <input type="checkbox"/> Bubalinos		2. MARCA DO REBANHO: 040154	
3. AVES: <input type="checkbox"/> Aves <input type="checkbox"/> Ovos Férteis <input type="checkbox"/> Bisavós <input type="checkbox"/> Corte <input type="checkbox"/> Macho <input type="checkbox"/> Fêmeas <input type="checkbox"/> Total		4. SUÍDEOS: <input type="checkbox"/> Machos <input type="checkbox"/> Fêmeas <input type="checkbox"/> Total	
5. ANIMAIS DE LABORATÓRIO: <input checked="" type="checkbox"/>		6. CAPRINOS: <input type="checkbox"/> Até 12 meses <input type="checkbox"/> Acima de 12 meses <input type="checkbox"/> Total	
7. OVINOS: <input type="checkbox"/>		8. EQUÍDEOS: <input type="checkbox"/> Equinos <input type="checkbox"/> Asininos <input type="checkbox"/> Mulsos	
9. ANIMAIS ZOO-TÉCNICOS: <input type="checkbox"/> Perua <input type="checkbox"/> Curiatá <input type="checkbox"/> Molang <input type="checkbox"/> Outros		10. TOTAL: <input type="checkbox"/>	
11. LOCAL DE ORIGEM: Campinas			
12. DESTINO: Brasília		13. TRANSPORTE: <input checked="" type="checkbox"/> Rodoviário <input type="checkbox"/> Ferroviário <input checked="" type="checkbox"/> Aéreo <input type="checkbox"/> Marítimo/Fluvial	
14. ATESTADO DE EXAMES: <input checked="" type="checkbox"/>			
15. OBSERVAÇÕES:		16. UNIDADE EXPEDIDORA: EDA de Campinas	
17. IDENTIFICAÇÃO E ASSINATURA DO EMITENTE: Michel Vaz de Oliveira		18. EMISSÃO: Local: Campinas SP, Data: 06/08/2017, Hora: 13:14	

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO



3510 0401 5450 6062 0170 8000 0007 0095 0208 4700 1088

ANEXO J - Tabela de conversão de unidades de pressão

	atm	ata (kg/cm^2)	Torr (mm Hg)	in Hg (32°F)	mm water (4°C)	in water (60°F)	bar	Mpa	Kpa	PSI (lb/in)
atm	1	1.033	760	29.92	10332.56	406.79	1.013	0.1013	101.32	14.69
ata (kg/cm^2)	0.968	1	735.56	28.96	10000.03	393.71	0.981	0.0981	98.07	14.22
Torr (mm Hg)	1.316×10^{-3}	1.36×10^{-3}	1	0.03937	13.60	0.535	1.333×10^{-3}	1.333×10^{-4}	0.1333	0.0194
in Hg (32°F)	0.03342	0.0345	25.4	1	345.40	13.60	0.03386	3.387×10^{-3}	3.387	0.491
mm water (4°C)	9.67×10^{-5}	9.99×10^{-5}	0.0736	2.895×10^{-3}	1	2.904×10^{-3}	9.81×10^{-5}	9.81×10^{-6}	9.81×10^{-3}	1.422×10^{-3}
in water (60°F)	2.456×10^{-3}	2.54×10^{-3}	1.866	0.0736	25.4	1	2.49×10^{-3}	2.49×10^{-4}	0.249	0.03613
bar	0.9872	1.02	750.06	29.53	10197.44	401.47	1	0.1	100	14.50
Mpa	9.872	10.20	7500	295.3	101974.42	4018.60	10	1	1000	145
Kpa	9.87×10^{-3}	0.01	7.50	0.2953	101.97	4.018	0.01	0.001	1	0.145
PSI (lb/in)	0.068	0.070	51.71	2.036	703.09	27.71	0.0689	6.893×10^{-3}	6.893	1

Fonte: <http://www.pipfittingweb.com/news/Pressure%20Unit%20Conversion%20Table.pdf>

ANEXO L - Formulação da ração extrusada para ratos presence

Níveis de Garantia

Umidade (máx)	130,00 g/kg
Proteína bruta (mín)	230,00 g/kg
Extrato etéreo (mín)	40,00 g/kg
Fibra bruta (máx)	50,00 g/kg
Matéria mineral (máx)	100,00 g/kg
Cálcio (mín)	12,00 g/kg
Cálcio (máx)	13,00 g/kg
Fósforo (mín)	8.500,00 mg/kg
Sódio (mín)	2.700,00 mg/kg
Magnésio (mín)	500,00 mg/kg
Ferro (mín)	180,00 mg/kg
Cobre (mín)	30,00 mg/kg
Manganês (mín)	110,00 mg/kg
Zinco (mín)	110,00 mg/kg
Iodo (mín)	1,00 mg/kg
Cobalto (mín)	2,00 mg/kg
Selênio (mín)	0,20 mg/kg
Vitamina A (mín)	25.500,00 UI/kg
Vitamina D3 (mín)	4.000,00 UI/kg
Vitamina E (mín)	82,00 UI/kg
Vitamina K3 (mín)	6,40 mg/kg
Vitamina B1 (mín)	11,00 mg/kg
Vitamina B2 (mín)	12,00 mg/kg
Niacina (mín)	219,00 mg/kg
Ácido pantotênico (mín)	90,00 mg/kg
Vitamina B6 (mín)	11,00 mg/kg
Ácido fólico (mín)	13,00 mg/kg
Biotina (mín)	0,10 mg/kg
Vitamina B12 (mín)	40,00 mcg/kg
Olina (mín)	1.800,00 mg/kg
Lisina (mín)	12,50 g/kg
Metionina (mín)	3.500,00 mg/kg

Composição Básica

Farelo de soja*, milho integral moído, dextrina, casca de arroz, farelo de trigo, farelo de arroz, óleo de soja refinado*, farinha de carne e ossos, farinha de peixe, calcário calcítico, cloreto de sódio (sal comum), óxido de magnésio, sulfato de ferro, sulfato de cobre, monóxido de manganês, óxido de zinco, iodato de cálcio, sulfato de cobalto, selenito de sódio, vitamina A, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, vitamina B1, vitamina B2, niacina, ácido pantotênico, vitamina B6, ácido fólico, biotina, vitamina B12, cloreto de colina, lisina, metionina, ácido propiônico. Espécies doadoras do gene: **Agrobacterium tumefaciens* e/ou *Arabidopsis thaliana* e/ou *Bacillus thuringiensis* e/ou *Streptomyces viridochromogenes* e/ou *Zea mays*.