

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA**

**INFLUÊNCIA DA MANUTENÇÃO DO TECIDO ESPLÊNICO NA
SOBREVIDA E NOS LINFÓCITOS TCD4 E TCD8 DE RATOS
SUBMETIDOS À PERITONITE FECAL**

ANDRÉA SAADE DAHER BORJAILI

**BELO HORIZONTE
2020**

ANDRÉA SAADE DAHER BORJAILI

**INFLUÊNCIA DA MANUTENÇÃO DO TECIDO ESPLÊNICO NA
SOBREVIDA E NOS LINFÓCITOS TCD4 E TCD8 DE RATOS
SUBMETIDOS À PERITONITE FECAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor.

Área de concentração: Resposta Inflamatória à Agressão Tecidual.

Linha de pesquisa: Repercussões Locais e Sistêmicas em Lesões Teciduais e em Fármacos Aplicados em Cirurgia.

Orientador: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes.

Coorientador: Prof. Dr. Danilo Nagib Salomão Paulo.

**BELO HORIZONTE
FACULDADE DE MEDICINA – UFMG
2020**

B734i Borjaili, Andréa Saade Daher.
Influência da manutenção do Tecido Esplênico na sobrevida e nos Linfócitos TCD4 E TCD8 de ratos submetidos à Peritonite Fecal [recursos eletrônicos]. / Andréa Saade Daher Borjaili. - - Belo Horizonte: 2020.
54f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Tarcizo Afonso Nunes.
Coorientador (a): Danilo Nagib Salomão Paulo.
Área de concentração: Resposta Inflamatória à Agressão Tecidual.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Esplenectomia. 2. Peritonite. 3. Taxa de Sobrevida. 4. Linfócitos T. 5. Ratos. 6. Dissertação Acadêmica. I. Nunes, Tarcizo Afonso. II. Paulo, Danilo Nagib Salomão. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WA 900

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

**INFLUÊNCIA DA MANUTENÇÃO DO TECIDO ESPLÊNICO NA SOBREVIDA E NOS LINFÓCITOS TCD4 E TCD8 DE RATOS
SUBMETIDOS À PERITONITE FECAL**

ANDREA SAADE DAHER BORJAILI

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia **cinco de outubro de dois mil e vinte**, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores:

MARCELA SOUZA LIMA PAULO

EMESCAM

ISABELA PASSOS PEREIRA QUINTAES

UFES

ANDY PETROIANU

UFMG

VIVIAN RESENDE

UFMG

TARCIZO AFONSO NUNES - Orientador

UFMG

Belo Horizonte, 05 de outubro de 2020.



Documento assinado eletronicamente por **Tarcizo Afonso Nunes, Coordenador(a)**, em 05/10/2020, às 18:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vivian Resende, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 06/10/2020, às 16:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcela Souza Lima Paulo, Usuário Externo**, em 19/10/2020, às 21:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andy Petroianu, Professor do Magistério Superior**, em 22/10/2020, às 14:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isabela Passos Pereira Quintaes, Usuário Externo**, em 29/10/2020, às 10:46, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0294777** e o código CRC **40C37DD4**.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitora: Prof^a. Dr^a. Sandra Regina Goulart Almeida

Vice-Reitor: Prof. Dr. Alessandro Fernandes Moreira

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Dr. Fábio Alves da Silva Júnior

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Dr. Mário Fernando Montenegro Campos

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Dr. Humberto José Alves

Vice-Diretora da Faculdade de Medicina: Prof^a. Dr^a. Alamanda Kfoury Pereira

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof^a. Dr^a. Eli lola Gurgel
Andrade

Chefe do Departamento de Cirurgia: Prof. Dr. Marco Antônio Gonçalves
Rodrigues

Subchefe do Departamento de Cirurgia: Prof. Dr. Bernardo Almeida Campos

Chefe do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia: Prof^a. Dr^a.
Flávio Barbosa Nunes

**Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e
à Oftalmologia:**

Prof^a. Dr^a. Vivian Resende (Coordenadora)

Prof. Dr. Túlio Pinho Navarro (Subcoordenador)

Prof. Dr. Daniel Vitor de Vasconcelos Santos

Prof. Dr. Marcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Marco Antônio Percope de Andrade

Aos meus queridos pais,
Marly e Camel (*in memoriam*),
pelo amor incondicional.

A Eduardo,
meu amado marido,
que sempre esteve ao meu lado,
com seu apoio, amor e paciência.

Aos meus amados filhos, Matheus e Eduarda,
razão da minha vida,
pela compreensão, amor e carinho.

Com eles tudo se torna mais fácil.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que proveu todas as coisas para a realização deste doutorado. Sem Ele, nada disso teria sido possível.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes, um agradecimento especial pelo incentivo e ajuda naqueles momentos mais difíceis, sempre presente com sua dedicada atenção e sabedoria.

Ao Prof. Dr. Danilo Nagib Salomão Paulo, pela sua contribuição e apoio na confecção deste trabalho, com muita dedicação e interesse sempre que solicitado.

À Profa. Dra. Marcela Souza Lima Paulo, pelo carinho, apoio, dedicação e por toda a colaboração na execução deste projeto. Sua ajuda foi fundamental.

Aos acadêmicos de Medicina da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM), Giseli Celestino Nunes, Julia Belizário Silveira, Flávia Heiderich Dall'Orto, Gabriel Souza Lorenzoni e Matheus Eduardo Daher Borjaili, pela preciosa ajuda em todo o decorrer do desenvolvimento deste projeto. Pela boa vontade, apoio e disponibilidade nos momentos de precisão.

À Profa. Dra. Bianca Campagnaro, pela disposição e contribuição na parte da imunofenotipagem, com a análise dos resultados da leitura das células mononucleares por meio da citometria de fluxo, o que muito contribuiu para o bom andamento da pesquisa.

A Raquel de Azevedo Benevides, colega veterinária, pela colaboração nos cuidados e manutenção dos nossos pequenos animais, com muita dedicação e carinho.

À Profa. Dra. Maressa Cristiane Malini de Lima, pela contribuição em todo o processo de preparo das células mononucleares.

À Profa. Lúcia Helena Sagrillo Pimassoni, pela sua contribuição indispensável na análise estatística.

A Luiz Antônio de Oliveira, funcionário da EMESCAM, pela colaboração indispensável neste trabalho. Sempre solicito em todos os momentos.

Ao Laboratório de Fisiologia Translacional do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), por proporcionar o acesso aos seus recursos técnicos, contribuindo, assim, com resultados mais precisos.

À Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM), pelo incentivo à pesquisa experimental e pela estrutura física, equipamentos e corpo técnico disponíveis.

À Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), por intermédio do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia, pela oportunidade de desenvolver este projeto de pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (Edital FAPES nº 006/2014 - Universal – Processo nº 67605575), pelo suporte financeiro.

Ao Departamento de Apoio à Pesquisa Clínica e Experimental do Instituto de Desenvolvimento Sustentável e Procedimentos na Área de Saúde (Instituto Solidário).

Ao Programa de Iniciação Científica e Tecnológica da EMESCAM, pelo financiamento de bolsas aos estudantes de Medicina para realização do trabalho.

HOMENAGEM

A minha família, sempre presente em tudo que eu faço, com seu amor, carinho e compreensão que me impulsionam cada vez mais a seguir no meu caminho, com força e coragem, superando todos os obstáculos, na certeza de que no final a vitória será alcançada.

RESUMO

Introdução: os animais asplênicos são mais suscetíveis a infecções graves, entre as quais se destacam a sepse fulminante e a peritonite, cuja mortalidade ainda persiste em níveis elevados. **Objetivos:** comparar a sobrevida de ratos submetidos aos diferentes tipos de procedimentos no baço, após indução de peritonite fecal. Verificar ocorrência de alteração da contagem de linfócitos TCD4 e CD8, antes e após os procedimentos no baço. Correlacionar a sobrevida dos animais submetidos aos diversos procedimentos no baço, seguida da indução de peritonite fecal com contagem dos linfócitos TCD4 e CD8. **Método:** foram distribuídos 30 ratos machos, *Wistar*, entre dois e três meses de idade, em três grupos: grupo MB (n=10), manipulação do baço; grupo ET (n=10), esplenectomia total; grupo ESTPI (n=10), esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior. Os animais foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos conforme delineamento proposto para cada grupo. Setenta dias depois, cada animal foi submetido à injeção de fezes do próprio animal, com o propósito de induzir peritonite fecal, e o tempo de sobrevida foi anotado a partir desse momento até a hora do óbito. Todos os animais foram submetidos à coleta de sangue por duas vezes, antes de serem operados (T1) e 70 dias após as cirurgias (T2) para contagem dos linfócitos TCD4 e CD8 por citometria de fluxo. A taxa de sobrevida dos animais de cada grupo foi calculada em horas e comparada entre os grupos, empregando-se o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e a análise de sobrevivência de Kaplan Meier. Para calcular a quantidade de linfócitos TCD4 e TCD8 antes e após os procedimentos cirúrgicos, utilizou-se o teste de Wilcoxon. Para correlacionar o percentual de linfócitos com o tempo de vida dos animais, foi calculado o coeficiente de Spearman. O valor-p menor que 5% foi considerado significativo. **Resultados:** tempo mediano de vida foi maior no grupo 3 (esplenectomia subtotal) e grupo 1 (manipulação do baço) e menor no grupo 2 (esplenectomia total), com diferença significativa entre eles ($p=0,013$). A comparação da mediana do número de CD4, antes e após o procedimento cirúrgico em cada grupo, não apresentou alteração em qualquer dos três grupos ($p>0,05$). Entretanto, a comparação da mediana do número de CD8, antes e após o procedimento cirúrgico, diminuiu nos grupos manipulação do baço ($p=0,022$) e ESTPI ($p=0,017$). A correlação entre a mediana do número de linfócitos CD4 e CD8 e a sobrevida dos animais de todos os grupos não foi significativa ($p>0,05$). **Conclusões:** a manutenção do tecido esplênico contribuiu para aumentar a sobrevida dos ratos. O número de linfócitos TCD4 e TCD8 não teve relação com a sobrevida dos animais. Houve diminuição do número de linfócitos TCD8 nos grupos de animais nos quais foram preservados tecidos esplênicos.

Palavras-chave: esplenectomia; peritonite; taxa de sobrevida. linfócitos T. ratos.

ABSTRACT

Introduction: Asplenic animals are more susceptible to severe infections such as fulminant sepsis and peritonitis, whose mortality rates remain significantly high. **Aims:** Comparing the survival time of rats subjected to different spleen procedure types, after fecal peritonitis. Investigating whether there were changes in CD4 and CD8 T lymphocyte count, before and after spleen procedures. Correlating the survival of animals subjected to different spleen procedures, followed by peritonitis induction, based on CD4 and CD8 T lymphocytes. **Method:** thirty young male Wistar rats were distributed into three groups comprising 10 animals each: group MB (n=10) - animals were subjected to spleen manipulation; group ET (n=10) - animals were subjected to total splenectomy; group ESTPI (n=10) - animals were subjected to subtotal splenectomy preserving the lower pole. All animals were subjected to blood collection at two different times - before surgery (T1) and 70 days after surgery (T2) – in order to count CD4/CD8 T lymphocytes based on flow cytometry. Seven days later, each animal was injected with its own feces in order to induce fecal peritonitis; their survival time was recorded from the injection time until animals' time of death. Survival rate was calculated and compared between groups. Non-parametric Kruskal-Wallis test and Kaplan Meier survival analysis were used to compare survival time (in hours) between groups. Wilcoxon test was used to calculate the number of CD4 and CD8 T lymphocytes before and after surgical procedures. Spearman's coefficient was calculated to correlate the percentage of lymphocytes to animals' life span. P-value lower than 5% was considered significant. **Results:** Group 3 (subtotal splenectomy) recorded the longest median lifespan, whereas group 2 (total splenectomy) recorded the shortest one; there was significant difference in lifespan among the three groups ($p = 0.013$). The percentage of CD4 lymphocytes before and after the surgical procedure did not significantly change in any of the three groups ($p > 0.05$). However, the percentage of CD8 lymphocytes presented significant decrease in the spleen manipulation and TSPLP groups ($p = 0.017$), after the surgical procedure ($p = 0.022$). There was not significant correlation between the percentage of CD4 and CD8 lymphocytes and animal survival rates in all groups ($p > 0.05$). **Conclusions:** The survival time of rats subjected to different spleen procedure types, and who were not treated for fecal peritonitis, recorded significant difference among the three groups; Group 2 recorded the shortest survival time. There was decreased number of CD8 T lymphocytes in animals subjected to spleen manipulation and TSPLP. The CD4 and CD8 T lymphocyte count was not correlated to the survival of animals subjected to the different spleen procedures investigated in the current study.

Keywords: splenectomy; peritonitis; survival rate; T-lymphocytes; rats.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Fotografia digital mostra a via de acesso à cavidade peritoneal do rato.....	21
FIGURA 2 - Fotografia do rato do grupo 1, laparotomizado, com exposição do estômago e do baço, sendo este submetido somente à manipulação.....	22
FIGURA 3 - Fotografia do baço íntegro extirpado de rato do grupo 2.....	23
FIGURA 4 - Estudo de um animal do grupo 3.....	24
FIGURA 5 - Ratos mantidos em gaiolas coletivas após os procedimentos cirúrgicos.....	25
FIGURA 6 - Aparelho de citometria de fluxo FACSCanto II.....	26
FIGURA 7 - FSC x SSC.....	28
FIGURA 8 - Fotografia digital do rato anestesiado e sendo submetido à injeção de solução de fezes na cavidade peritoneal para indução da peritonite.....	29

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Caixa do tempo de vida por grupo de animais.....	32
GRÁFICO 2 - Curva de sobrevida dos animais por grupo (Kaplan-Meier).....	33

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Comparação do tempo de sobrevida entre os três grupos de animais, em horas.....	31
TABELA 2 - Comparação da mediana do número de linfócitos TCD4, antes e depois dos procedimentos no baço, nos três grupos de animais.....	33
TABELA 3 - Comparação da mediana do número de linfócitos TCD8, antes e depois dos procedimentos no baço, nos três grupos de animais.....	34
TABELA 4 - Correlação entre o número de linfócitos TCD4 e TCD8 e a sobrevida dos animais submetidos aos procedimentos no baço e peritonite fecal.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BD	Bencton e Dickinson
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD4	linfócitos T <i>helper</i>
CD8	Linfócitos citotóxicos
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CMN	Células mononucleares
d	Depois dos procedimentos no baço
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
DP	Desvio-padrão
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMESCAM	Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória
ESTPI	Esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior
ET	Esplenectomia total
EUA	Estados Unidos da América
FACS	Separador Celular Ativado por Fluorescência
FAPES	Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo
FCS	<i>Finite Capacity Scheduling</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IgG	Imunoglobulina G
LASER	<i>Light amplification by stimulated emission of radiation</i>
LEA	Laboratório de Experimentação Animal
OPSS	<i>Overwhelming post splenectomy sepsis</i>
PBS	Phosphato Buffered Saline
PE	Ficoeritrina
SSC	<i>Side scatter</i>
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	19
3 MÉTODO.....	20
3.1 Composição dos grupos de animais.....	20
3.2 Preparação dos animais, anestesia e procedimentos cirúrgicos.....	20
3.3 Pós-operatório.....	24
3.4 Imunofenotipagem.....	25
3.5 Indução da peritonite.....	29
3.6 Sobrevida dos animais.....	30
3.7 Variáveis estudadas e testes estatísticos.....	30
4 RESULTADOS.....	31
4.1 Sobrevida dos animais.....	31
4.2 Comparação do número de linfócitos TCD4 antes e depois dos procedimentos no baço.....	33
4.3 Comparação do número de linfócitos TCD8 antes e depois dos procedimentos no baço.....	34
4.4 Correlação entre a sobrevida dos animais e o número de linfócitos TCD4 e TCD8 depois dos procedimentos no baço.....	34
5 DISCUSSÃO.....	35
6 CONCLUSÕES.....	41
REFERÊNCIAS.....	42
APÊNDICE E ANEXOS.....	49

¹ Este trabalho foi revisado com base nas novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. E foi formatado de acordo com a ABNT NBR 14724 de 2019.

1 INTRODUÇÃO

O baço é o maior dos órgãos linfáticos e participa ativamente do sistema de defesa do corpo como local de proliferação de linfócitos e resposta imune¹. Atua como filtro imunitário capaz de limpar, a cada minuto, aproximadamente 4% do volume sanguíneo corporal na produção de linfócitos e monócitos e na fagocitose de partículas estranhas, bactérias, vírus e leucócitos, além de processar fatores séricos, como as opsoninas, que têm a função de estimular a fagocitose². O melhor conhecimento do baço e de suas funções tem influenciado o emprego de condutas, com o intuito de preservar o tecido esplênico^{3,4}.

A ideia de que a retirada do baço era isenta de complicações passou a ser contestada quando se verificou que esse órgão era indispensável ao desempenho de vários mecanismos de defesa do organismo⁵. Em 1952, constatou-se sepse fulminante em cinco crianças submetidas à esplenectomia total devido à esferocitose⁶. A partir desse trabalho, o risco de infecção pós-esplenectomia tem sido considerado tanto em crianças quanto em adultos e, assim, ficou conhecida a importância do baço, principalmente nas infecções agudas.

Atualmente, o risco de desenvolver sepse grave pós-esplenectomia (*overwhelming post splenectomy sepsis* - OPSS) em qualquer idade e em qualquer momento é de 5%. Em mais da metade dos casos a sepse ocorre nos primeiros dois anos⁷, com taxa de mortalidade superior a 50%⁸. Pensava-se que o risco era apenas nos primeiros anos após a esplenectomia, no entanto, verificaram-se casos relatados que ocorreram entre 10 e 30 anos após a cirurgia⁹.

Pacientes submetidos à esplenectomia tornam-se mais suscetíveis a infecções por bactérias, fungos, vírus ou protozoários. Os agentes etiológicos responsáveis pelo maior número de infecções são as bactérias encapsuladas *Streptococcus pneumoniae* (aproximadamente 50% dos casos) seguidas de *Haemophilus influenzae* tipo B e *Neisseria meningitidis*⁹.

A peritonite caracteriza-se por ser um processo inflamatório da cavidade peritoneal, que ocorre devido a diversas doenças que culminam com operações abdominais de urgência/emergência. É infecção grave, que pode causar a morte do indivíduo se não tratada adequadamente e em tempo hábil. Essa infecção pode variar de gravidade dependendo de vários fatores, tais como tempo de evolução e resposta individual de cada organismo. É classificada quanto à origem em primária, secundária

e terciária. As peritonites secundárias às doenças inflamatórias complicadas de órgãos intra-abdominais, tais como apendicite ou diverticulite agudas, são as mais frequentes¹⁰. É consenso entre alguns autores que a peritonite pós-operatória é mais grave¹¹⁻¹⁶, embora nem sempre isso seja encontrado^{17,18}.

O tratamento da peritonite secundária inclui remoção mecânica de contaminantes por meio de lavagens peritoneais com solução salina, administração de antimicrobianos, restauração de integridade abdominal e realização dos cuidados no pós-operatório em unidades de tratamento intensivo e cirúrgico. Mesmo com esses avanços, atualmente a peritonite é responsável por aproximadamente 50% dos óbitos por sepse¹⁹⁻²¹. Fatores prognósticos associados à alta mortalidade estão relacionados à não identificação do foco primário ou seu controle, a pacientes idosos, imunossuprimidos e estado comatoso²².

Estudos em que se induziu peritonite em ratos mostraram que os animais submetidos à esplenectomia total apresentaram mais mortalidade em comparação aos que não foram esplenectomizados²³. E, ainda, que os animais submetidos à esplenectomia total associada a implante esplênico autógeno não evitou o óbito²⁴. Outro estudo identificou redução da capacidade fagocitária em ratos após esplenectomia total e indução de processo inflamatório em comparação a ratos que foram mantidos com o baço íntegro²⁵.

O papel do baço na homeostase da função imune consiste em participar do armazenamento de linfócitos, como também de sua transformação e proliferação²⁶. O baço é um órgão linfoide secundário com ampla diversidade celular e microambiente altamente compartimentalizado. Nele é iniciado o desenvolvimento da resposta imunológica adaptativa frente a patógenos recolhidos do sangue. Esse órgão alberga as células necessárias ao desenvolvimento da resposta imunológica, segregadas em áreas específicas e regiões de interação e apresentação antigênica^{27,28}.

As células do sistema imune estão presentes em grande número, 25% de todos os linfócitos T e 10-15% de todos os linfócitos B²⁹, sendo responsável por importantes funções, como o início da resposta imune, com a realização de fagocitose e a produção de anticorpos. A função esplênica somada à sua estrutura tecidual altamente compartimentalizada confere ao baço a característica de órgão fundamental para o desenvolvimento da imunidade reativa contra diversos microrganismos oriundos do sangue²⁸.

A resposta imunológica é categorizada em dois grupos: imunidade inata, também chamada de natural ou nativa, e imunidade adaptativa, que pode ser específica ou adquirida³⁰. A resposta imune inata corresponde à primeira linha de defesa do organismo, em que os mecanismos efetores são ativados de forma rápida. A imunidade inata constitui a primeira ação de resposta do sistema imunológico contra microrganismos. Esta não guarda memória e não é específica, de modo que reage da mesma forma para todos os casos de infecção^{30,31}. A imunidade inata é definida por alguns autores³² como o conjunto de mecanismos de defesa que não se alteram durante a vida do organismo hospedeiro³².

A imunidade adquirida (ou adaptativa), por sua vez, é uma resposta mais demorada, por isso mais específica, sendo dividida em celular e humoral. Essa imunidade confere memória imunológica às células do seu sistema (linfócitos T e B) e possibilita a adaptação do corpo a determinados microrganismos. Os linfócitos T são os efetores da resposta mediada por células, enquanto que os anticorpos (imunoglobulinas) são os responsáveis pela resposta humoral³⁰. O linfócito B é a principal célula dessa imunidade e caracteriza-se por ser o único capaz de produzir anticorpo³⁰.

A imunidade adaptativa caracteriza-se por realizar a resposta imunológica tardia. Difere da imunidade inata, pois possibilita a geração de especificidade para antígenos distintos e memoriza (memória) as exposições anteriores aos patógenos. Nessa fase entram em cena os linfócitos, que são classificados como as principais células da imunidade adaptativa e são diferenciados de acordo com sua origem (timo, medula óssea) e as proteínas de suas superfícies, que recebem o nome de *cluster of differentiation* (CD). Os linfócitos principais são denominados B e T³⁰.

A retirada do baço representa a perda de um sítio importante de alocação e controle dessas células linfoides, interferindo em sua organização e circulação³³⁻³⁵. Além disso, altera os padrões de migração das células brancas, em especial de linfócitos, causando seu acúmulo no sangue periférico³⁶. Adicionalmente, há algumas constatações acerca de alterações hematológicas, que também podem contribuir para a modificação da função imune. Observou-se que, após esplenectomia, verifica-se aumento no número total de leucócitos no sangue, principalmente linfócitos³⁷. Supõe-se que esse aumento pode ser devido tanto à exacerbação da atividade da medula óssea, quanto à remoção de um sítio importante de alocação dessas células^{38,39}.

Notam-se, ainda, alterações no número de granulócitos e de linfócitos T totais, TCD4+ e TCD8+, tanto em humanos⁴⁰ quanto em animais^{41,42}.

Acredita-se que, quando se faz necessária a esplenectomia, as formas de se evitar a sepse é a preservação do tecido esplênico por meio de esplenectomia parcial ou autoimplante de tecido esplênico, principalmente em crianças. No entanto, há controvérsias sobre a forma de se manter o tecido esplênico, sendo que uma das opções é a preservação do polo inferior após esplenectomia subtotal, proposta por pesquisa conduzida em 2011⁴³. Mas ainda persistem controvérsias se esse polo do baço é suficiente para manter a função imunitária e prolongar a sobrevivência dos animais⁴⁴. Assim, propusemos a realização desta pesquisa, com a expectativa de contribuir para dirimir essas controvérsias.

2 OBJETIVOS

- a) Comparar a sobrevivência de ratos submetidos aos diversos procedimentos no baço, como manipulação do baço, esplenectomia total e esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior do baço, após indução de peritonite fecal.
- b) Verificar alteração da contagem de linfócitos TCD4 e TCD8 após os procedimentos no baço.
- c) Correlacionar a sobrevivência dos animais submetidos aos diversos procedimentos no baço e indução de peritonite fecal com contagem de linfócitos TCD4 e TCD8.

3 MÉTODO

Trata-se de pesquisa experimental, prospectiva, realizada em ratos no Biotério de Experimentação Animal (BEA) do Centro de Pesquisa da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória-ES (EMESCAM). A manipulação dos animais seguiu a legislação vigente que regulamenta o uso de animais em pesquisa no Brasil (Lei nº 11.794/2008).

O projeto foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG (CEUA - Protocolo nº 275/2015 – ANEXO A) e pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da EMESCAM (CEUA - Protocolo nº 001/2015 – ANEXO C).

3.1 Composição dos grupos de animais

Foram utilizados 30 ratos da linhagem *Wistar*, machos, entre dois e três meses de idade, com peso médio de 320 g, distribuídos aleatoriamente em três grupos de 10 ratos cada, de acordo com o tipo de procedimento cirúrgico a que eles foram submetidos:

- a) Grupo MB (n=10) - manipulação do baço;
- b) Grupo ET (n=10) - esplenectomia total;
- c) Grupo ESTPI (n=10)- esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior do baço.

3.2 Preparação dos animais, anestesia e procedimentos cirúrgicos

Os ratos foram pesados e anestesiados via intraperitoneal com cloridrato de cetamina (Vetaset®), dose de 75 mg/kg, associado a cloridrato de xilazina (Kensol®), dose de 5 mg/kg, seguido de tricotomia da parede abdominal e torácica, imobilização do rato na mesa cirúrgica em decúbito dorsal e antissepsia ampla da pele com solução alcoólica de polivinilpirrolidona-iodo a 10%.

A via de acesso à cavidade peritoneal de todos os animais foi por incisão longitudinal e mediana da pele e tela subcutânea com 2,5 cm de comprimento, que se

estendeu de 0,5 cm abaixo do processo xifoide até o púbis, abertura da linha alba e peritônio, seguida de exame da cavidade abdominal (FIG. 1).



FIGURA 1 - Fotografia digital mostra a via de acesso à cavidade peritoneal do rato.

Após a laparotomia, os procedimentos no baço foram realizados de acordo com o delineamento da pesquisa:

- a) Nos animais do grupo MB, realizou-se somente a manipulação do baço (FIG. 2);

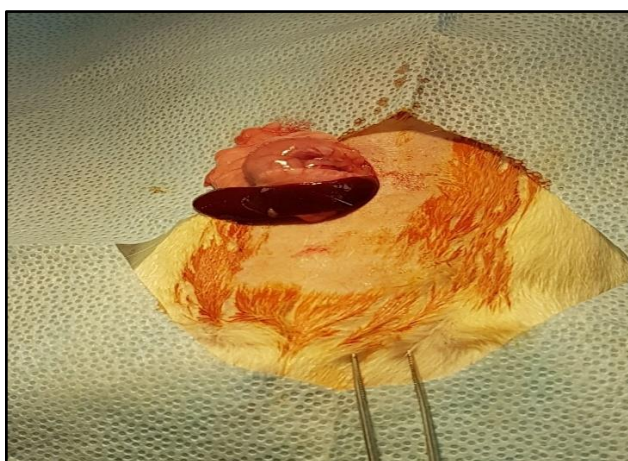


FIGURA 2 - Fotografia do rato do grupo MB, laparotomizado, com exposição do estômago e do baço, sendo este submetido somente à manipulação.

- b) nos animais do grupo ET, realizou-se esplenectomia total após a laqueadura dos vasos do pedículo esplênico e dos ligamentos periféricos ao órgão, com pontos separados de fio de mononylon 5.0 (FIG. 3);



FIGURA 3 - Fotografia do baço íntegro extirpado de rato do grupo ET.

- c) nos animais do grupo ESTPI, realizou-se a esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior de acordo com a técnica proposta por Paulo *et al.*³², que consiste em: ligadura e secção dos vasos que irrigam a porção superior e média do baço, rente à borda esplênica, com mononylon 5.0; secção do baço abaixo dos vasos ligados; manutenção do polo inferior do baço irrigado por vasos do ligamento gastroesplênico, sendo sua borda cruenta mantida sem sutura ou colocação de omento (FIG. 4).

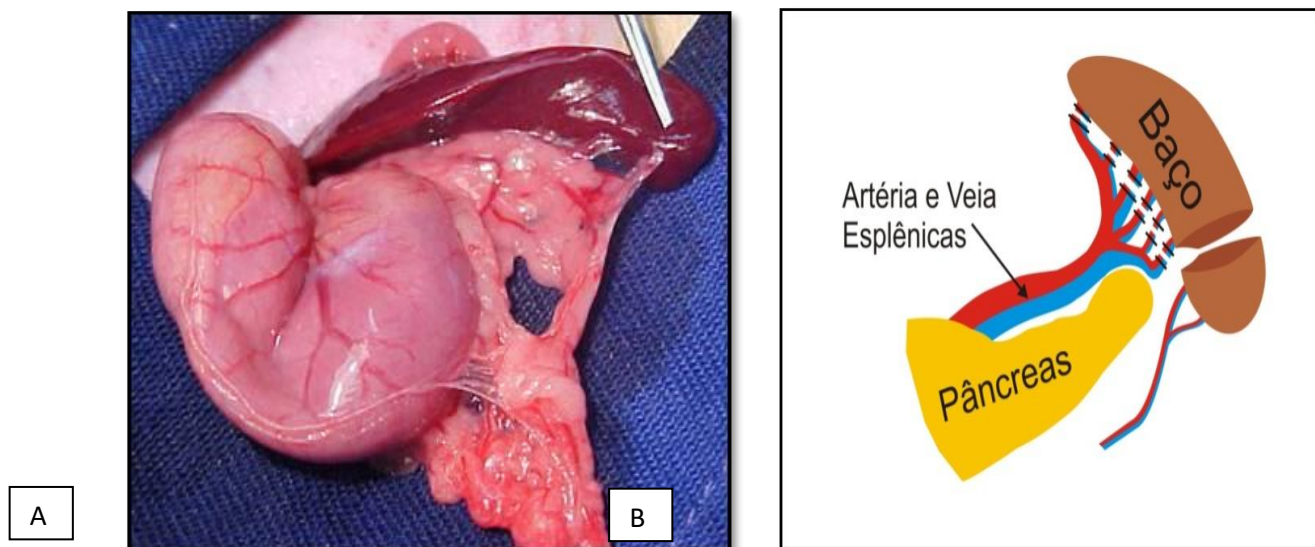


FIGURA 4 - Estudo de um animal do grupo ESTPI.

A) Fotografia identificando o estômago e o baço e a pinça apontando o polo inferior e a existência dos vasos gastroesplênicos; B) figura esquemática mostrando artéria e veia esplênica, ligadura e secção dos vasos que irrigam a porção superior e média do baço e secção do baço abaixo dos vasos ligados. Seu polo inferior foi mantido irrigado por vasos do ligamento gastroesplênico (ESTPI).

Após os procedimentos no baço, a laparorráfia foi feita por meio de sutura contínua com fio mononylon 5.0 em dois planos, sendo o primeiro o peritônio e musculoaponeurótico e o segundo a pele. Ao final das operações foram administrados 5 mL de solução salina 0,9% via subcutânea para reposição hidroeletrólítica, uma vez ao dia durante três dias.

3.3 Pós-operatório

No período pós-operatório, os animais foram agrupados em gaiolas coletivas com capacidade para três animais. A analgesia foi realizada com dipirona sódica na dose de 52,5 mg/dia, via oral, dissolvida em água do bebedouro (72 horas), dieta livre e água à vontade e cloridrato de nalbufina (Nubain®) na dose de 0,1 mg/Kg a cada 12 horas, durante três dias. A evolução dos animais foi registrada em ficha individual (FIG. 5).



FIGURA 5 - Ratos mantidos em gaiolas coletivas após os procedimentos cirúrgicos.

3.4 Imunofenotipagem

A influência do baço nas populações de linfócitos foi avaliada nos três grupos de animais por meio da imunofenotipagem de células TCD4 e TCD8 em sangue periférico coletado sob anestesia, nos tempos seguintes:

- a) T1 = sete dias antes do procedimento cirúrgico;
- b) T2 = 63 dias de pós-operatório.

Foi coletado 1 mL de sangue via caudal de cada animal no pré e no pós-operatório e colocado em tubos de 3 mL contendo anticoagulante (ácido etilenodiamino tetra-acético - EDTA). O isolamento de células mononucleares (CMN) foi realizado após cada tempo de coleta por meio de gradiente de densidade (Ficoll). Após o isolamento, foram feitas a ressuspensão das células na concentração necessária (10^6 células/mL) e a centrifugação, seguidas de ressuspensão em criotubo com solução de congelamento (5% de sulfóxido de dimetilo - DMSO - e 95% de soro fetal bovino). A amostra com solução de descongelamento permaneceu em *freezer overnight* a -20°C e armazenada a -80°C . Decorridos todos os tempos de coleta, as amostras seguiram protocolo de descongelamento em solução aquecida a 37°C de 20% de soro fetal bovino e *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM). As amostras

descongeladas foram centrifugadas, lavadas por duas vezes e ressuspensas em *Phosphato Buffered Saline* (PBS).

As 60 amostras de células mononucleares foram transportadas em isopor com gelo picado para o Laboratório de Fisiologia Translacional do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), onde foram analisadas em aparelho de citometria de fluxo, que tem como princípio a incidência de uma fonte de luz *Light amplification by stimulated emission of radiation* (LASER) que intercepta cada partícula (FIG. 6).

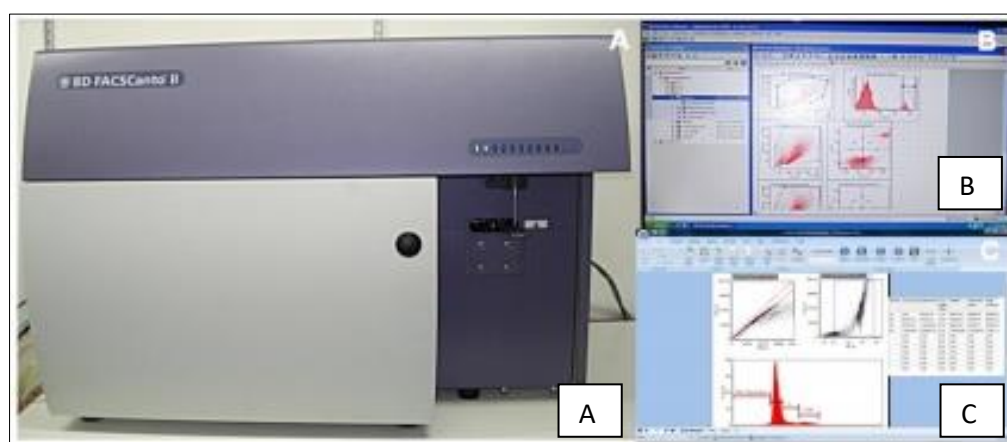


FIGURA 6 - Aparelho de citometria de fluxo FACSCanto II.

A) Fotografia do aparelho de citometria de fluxo FACSCanto II (BD Becton e Dickinson); B) *Layout* dos softwares utilizados na análise dos dados FACSDiva e C) FCS Express 4 Plus.

A dispersão da luz fornece dados relativos ao tamanho e à granularidade da partícula. Utilizaram-se os seguintes reagentes no uso do citômetro: PBS, soro fetal bovino, bloqueador do componente Fc (*FC Blocker*), anticorpo antiCD4 e antiCD8 marcado com fluorocromo e controle de isotipo para cada anticorpo correspondente.

Os ensaios de imunofenotipagem de leucócitos de sangue periférico foram realizados seguindo o protocolo proposto pelo fabricante (BD *Biosciences* – Estados Unidos da América - EUA). Esse protocolo foi realizado com o objetivo de identificar e quantificar linfócitos T *helper* (CD4) e citotóxicos (CD8) por meio do reconhecimento de antígenos de superfície específicos expressos nessas células. Para isso, foram utilizados os anticorpos antiCD4 (BD/*Pharmingen*), fortemente expressos na superfície de linfócitos T *helper*, conjugado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) e antiCD8a (BD/*Pharmingen*), fortemente expressos na superfície de linfócitos T citotóxicos, conjugado à ficoeritrina (PE).

As imunoglobulinas isotipo-específicas, não reagentes, marcadas com o mesmo fluorocromo (imunoglobulina G - IgG1-PE e IgG2a-FITC; BD/*Pharmingen*) foram utilizadas como controles. Após o protocolo de isolamento das células, dois tubos de citometria de fluxo foram separados, identificados e 10^5 células adicionados. Em seguida, visando reduzir a ligação mediada pelo receptor de Fc pelos anticorpos de interesse, as amostras foram incubadas com Rat BD Fc *Block* (BD *Biosciences* – EUA) a 4°C durante cinco minutos. Após o bloqueio de Fc, no primeiro tubo foram colocados 10 µL de cada anticorpo controle (IgG1-PE e IgG2a-FITC) e no segundo a mesma quantidade dos anticorpos marcadores, ou seja, 10 µL de CD4-FITC e CD8a-PE, e as amostras foram incubadas no escuro por 20 minutos. Decorrido esse tempo, as células foram lavadas em PBS para remover o excesso de anticorpo e, por fim, foi feita a aquisição de 30.000 eventos no FACSCanto II (separador celular ativado por fluorescência) e os dados foram analisados com auxílio do *software Finite Capacity Scheduling* (FCS Express).

A determinação das características celulares foi obtida por meio da emissão de fluorescência, por um filtro óptico, e estas eram representadas por um gráfico de dispersão de pontos ou *dot plot*. A análise convencional dos dados foi realizada por meio da seleção da população celular de interesse, baseada em aspectos morfológicos, a partir de gráficos do tipo *dot plot* de tamanho (FSC) *versus* granulosidade (*side scatter* - SSC) (FIG. 7). Após a seleção da região de interesse (R1), a frequência de subpopulações celulares fluorescentes (CD4 e CD8), dentro da população selecionada, foi obtida em gráficos bidimensionais de dispersão de pontos de fluorescência.

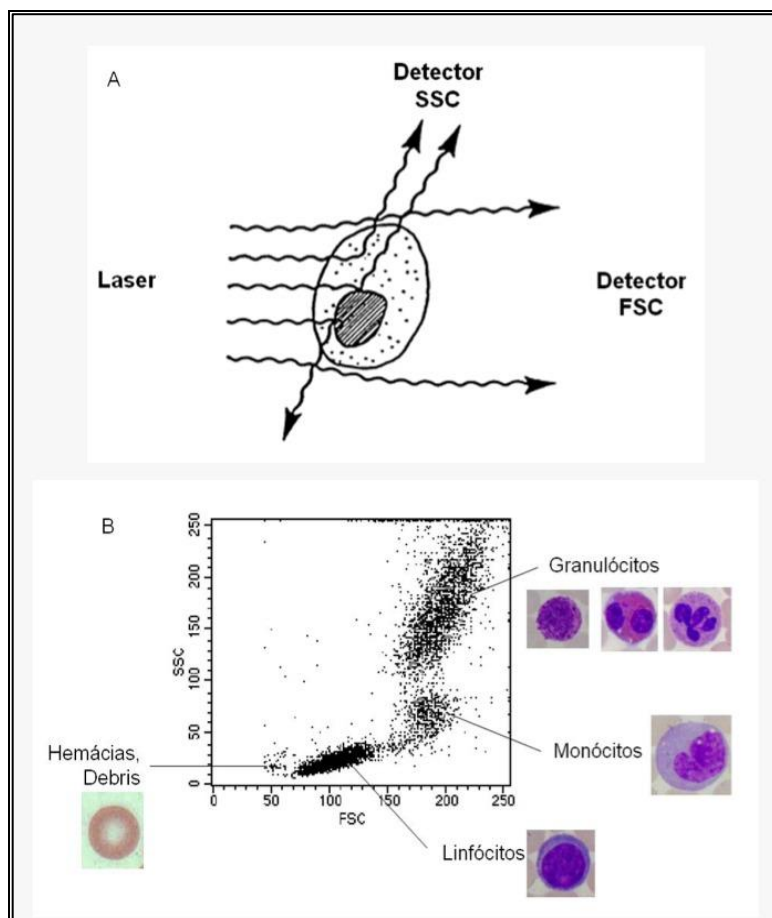


FIGURA 7 - FSC x SSC.

A) Esquema da luz dispersada e detectada pelos canais ópticos do citômetro de fluxo. **B)** Identificação de tipos celulares diferentes em uma amostra heterogênea de medula sanguínea. Modificado de: BD, 2000.

3.5 Indução da peritonite

A indução da peritonite nos ratos foi realizada 70 dias após os procedimentos cirúrgicos, mediante injeção na cavidade abdominal de 10 mL/Kg de peso da suspensão preparada com 2 g de fezes recém-defecadas do próprio rato, quantidade esta sabidamente letal⁴⁵. Essa suspensão foi preparada diluindo-se as fezes em 17 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9% e filtrada em compressa de gaze, a fim de possibilitar a sua passagem pela luz da agulha (FIG. 8).



FIGURA 8 - Fotografia digital do rato anestesiado e sendo submetido à injeção de solução de fezes na cavidade peritoneal para indução da peritonite.

3.6 Sobrevida dos animais

O tempo de sobrevida dos ratos foi anotado a partir da injeção de fezes em sua cavidade peritoneal até o momento do óbito. A taxa de sobrevida foi calculada e comparada entre os grupos.

3.7 Variáveis estudadas e testes estatísticos

- a) A comparação do tempo de sobrevida (em horas) entre os três grupos de animais foi feita pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, sendo que a comparação múltipla foi realizada pelo teste de Dunn. Na análise de sobrevivência foi usado o estimador de Kaplan Meier, e a comparação entre os grupos de animais foi feita pelo teste *Log Rank*;
- b) a correlação do tempo de sobrevida dos animais após a indução da peritonite com o percentual de linfócitos TCD4 e TCD8 foi obtida pelo teste de correlação de Spearman;
- c) a comparação da quantidade de linfócitos TCD4 e TCD8, antes e após os procedimentos no baço, foi conduzida pelo teste não paramétrico de Wilcoxon;
- d) foram considerados significativos valores de $p \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Sobrevida dos animais

Todos os animais submetidos aos procedimentos cirúrgicos sobreviveram até o momento da injeção de fezes na cavidade peritoneal, sendo que o menor tempo de vida foi 0,2 horas e o maior 15,8 horas, sendo o tempo médio de 9,1 horas e desvio-padrão de 4,1 horas.

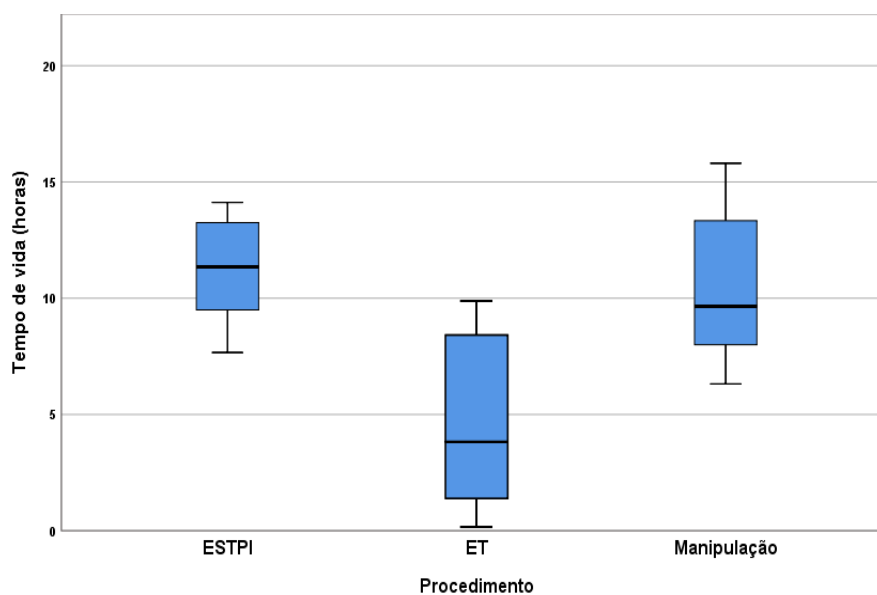
A mediana e a média do tempo de sobrevida dos animais do grupo 2 (ET) foram de 3,8 horas e 4,8 horas, respectivamente, sendo que o desvio-padrão representou 85,0% do tempo médio, o que denota alta variabilidade. No grupo 3 (ESTPI) a mediana e a média do tempo de sobrevida foram de 11,35 horas e 11,25 horas, respectivamente, e o desvio-padrão representou 20,3% do tempo médio, o que ressalta baixa variabilidade. A comparação entre os três grupos apurou diferença significativa ($p=0,013$) (TAB. 1).

TABELA 1 - Comparação do tempo de sobrevida entre os três grupos de animais, em horas.

Grupo de animais	Tempo de sobrevida dos animais em horas		<i>p</i>
	Mediana	Média ± DP	
Manipulação do baço	9,66 (8,00 - 13,33)	10,39 ± 2,94	0,013*
ET	3,83 (0,58 - 8,90)	4,79 ± 4,07	
ESTPI	11,35 (9,50 - 13,25)	11,25 ± 2,28	

Nota: ET - Esplenectomia total; ESTPI - esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior.
^a Teste não paramétrico de Kruskal – Wallis; * $p<0,05$. DP – desvio-padrão.

A comparação múltipla do tempo de vida entre os três grupos de animais revelou que houve diferença significativa entre eles (GRÁF. 1).

GRÁFICO 1 - Caixa do tempo de vida por grupo^a de animais.

Nota: ET - Esplenectomia total; ESTPI - esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior.

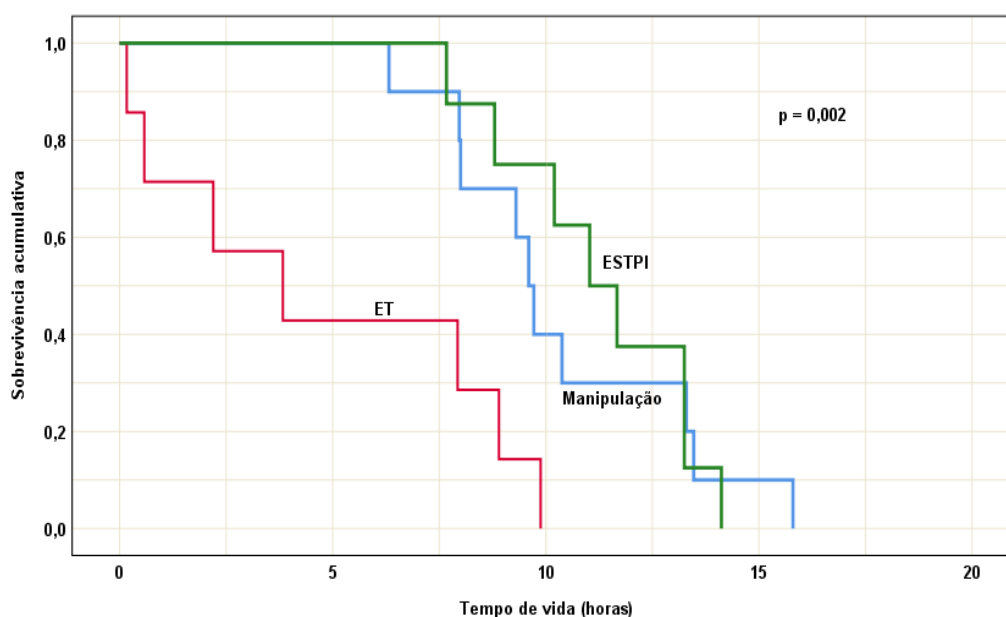
^a - Teste não paramétrico de Dunn

ESTPI *versus* ET - $p < 0,05$

ET *versus* Manipulação - $p < 0,05$

ESTPI *versus* Manipulação - $p > 0,05$

Após a indução da peritonite, a chance de sobrevida em 10 horas dos animais do grupo 2 (ET) foi de aproximadamente 10%; no grupo 1 (manipulação do baço) de 40%; e no grupo 3 (ESTPI) de 72%, cujas curvas de sobrevida dos animais apresentaram diferença significativa ($p = 0,002$) (GRÁF. 2).

GRÁFICO 2 - Curva de sobrevida dos animais por grupo (Kaplan-Meier).

Nota: ET – Esplenectomia total; ESTPI – Esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior.

4.2 Comparação do número de linfócitos TCD4 antes e depois dos procedimentos no baço

A comparação da mediana do número de linfócitos TCD4 nos animais dos três grupos, antes e depois dos procedimentos no baço, não apresentou diferença entre esses dois momentos de avaliação ($p>0,05$) (TAB. 2).

TABELA 2 - Comparação da mediana do número de linfócitos TCD4, antes e depois dos procedimentos no baço, nos três grupos de animais.

Grupos de animais	Contagem de linfócitos TCD4, em relação aos procedimentos no baço	Número de linfócitos TCD4			p
		Mínimo	Máximo	Mediana	
Manipulação do baço	Antes	13,87	26,17	24,08	0,401
	Depois	3,15	34,62	24,10	
ET	Antes	3,15	17,52	13,51	0,678
	Depois	4,55	26,64	15,80	
ESTPI	Antes	10,44	27,59	20,33	0,878
	Depois	2,43	24,47	19,59	

Nota: ET - Esplenectomia total; ESTPI - esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior. $p<0,05$ significativo*; $p>0,05$ não significativo.

4.3 Comparação do número de linfócitos TCD8 antes e depois dos procedimentos no baço

A comparação da mediana da contagem de linfócitos TCD8 nos animais dos três grupos, antes e depois dos procedimentos no baço, não encontrou diferença no grupo 2 (ET) ($p=0,953$), mas houve diferença entre esses dois momentos nos grupos 1 (manipulação do baço) ($p=0,022$) e 2 (ESTPI) ($p=0,017$) (TAB; 3).

TABELA 3 - Comparação da mediana do número de linfócitos TCD8, antes e depois dos procedimentos no baço, nos três grupos de animais.

Grupos de animais	Contagem de linfócitos TCD8, em relação aos procedimentos no baço	Número de linfócitos TCD8			p
		Mínimo	Máximo	Mediana	
Manipulação do baço	Antes	5,59	15,31	13,83	0,022*
	Depois	0,78	14,30	11,85	
ET	Antes	3,79	5,78	4,15	0,953
	Depois	0,84	5,07	4,38	
ESTPI	Antes	3,80	5,38	13,74	0,017*
	Depois	0,77	13,11	11,40	

Nota: ET - Esplenectomia total; ESTPI - esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior. $p < 0,05$ significativo*; $p > 0,05$ não significativo.

4.4 Correlação entre a sobrevida dos animais e o número de linfócitos TCD4 e TCD8 depois dos procedimentos no baço

O número de linfócitos TCD4 e TCD8 não se correlacionou com a sobrevida dos animais submetidos à peritonite fecal nos três grupos, ($p > 0,05$) (TAB. 4).

TABELA 4 - Correlação entre o número de linfócitos TCD4 e TCD8 e a sobrevida dos animais submetidos aos procedimentos no baço e peritonite fecal.

Grupos de animais	Linfócitos TCD4d x sobrevida		Linfócitos TCD8d x sobrevida	
	Coefficiente de correlação	p	Coefficiente de correlação	p
Manipulação do baço	0,33	0,347	- 0,35	0,328
ET	0,50	0,253	- 0,39	0,383
ESTPI	-0,08	0,844	0,04	0,933

Nota: ET - Esplenectomia total; ESTPI - esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior. Coeficiente de correlação de Spearman $p < 0,05$; d - depois dos procedimentos no baço.

5 DISCUSSÃO

A pesquisa sobre as relações entre baço e infecção se justifica, ainda nos dias de hoje, devido às controvérsias sobre esse tema. Acreditou-se durante muito tempo que a esplenectomia total não provocava sérias complicações, até ser constatada sepse fulminante em crianças submetidas a esse procedimento. A sepse pós-esplenectomia é uma entidade rara, mas está associada à elevada mortalidade, justificando a existência de estudos sobre a sua prevenção⁴⁶. Sabe-se que o paciente esplenectomizado ou asplênico fica mais suscetível a infecções por bactérias, vírus, fungos ou protozoários, uma vez que a imunidade é uma das funções nobres do baço⁴⁷. A ausência do baço repercute na medula óssea, no sistema mononuclear fagocitário, nos linfonodos e no fígado⁴⁸. Como órgão desse sistema, o baço desempenha importante papel na defesa do organismo, devido a seus mecanismos de filtração e fagocitose, além da produção de fatores do complemento e imunoglobulinas, em especial a IgM. Os pacientes que tiveram o baço removido apresentaram redução significativa na resposta imunológica primária, principalmente às bactérias encapsuladas, o que aumenta o risco de sepse e falência dos antimicrobianos com evolução rápida para óbito⁴⁹.

Modelos experimentais de sepse pós-esplenectomia relataram que há correlação entre esses dois eventos, uma vez que a remoção do baço aumentou a mortalidade decorrente de exposição a bactérias, por inoculação intranasal ou intravenosa, o que está diretamente relacionado à diminuição da taxa de remoção ou depuração dessas bactérias da corrente sanguínea⁵⁰. A infecção devastadora é uma complicação característica do paciente asplênico⁴⁹ e, na maioria dos casos, fatal⁵¹. A única maneira de evitar essa afecção adversa é a preservação do tecido esplênico, por meio de esplenectomia parcial ou transplante de tecido esplênico, principalmente em crianças.

A peritonite bacteriana é entidade nosológica grave, que deve ser tratada prontamente. A sepse associada à peritonite se dá em graus variáveis, dependendo da agressividade dos patógenos, da carga bacteriana, da extensão e duração da contaminação, da interação sinérgica, bem como da adequação da terapia inicial. Caso o tratamento seja incapaz de proporcionar o imediato controle da infecção peritoneal, poderão ocorrer endotoxemia e choque séptico⁵²⁻⁵⁴. Apesar da melhoria nos métodos diagnósticos, potentes antibióticos, modernas unidades de tratamento

intensivo e terapêutica cirúrgica criteriosa, cerca de um terço dos pacientes ainda morre de peritonite secundária grave^{52,53,55}.

Nesta pesquisa, a peritonite foi induzida pela injeção de fezes do próprio rato na cavidade peritoneal, com dose sabidamente letal. A escolha desse modelo baseou-se no fato de ele fornecer contaminação por flora mista, assemelhando-se às peritonites no homem, devido às diversas condições clínicas⁵⁶⁻⁵⁸. O modelo da peritonite sem tratamento causou a morte de todos os animais em curto espaço de tempo, fato este relatado por outros pesquisadores, pois nessas circunstâncias a mortalidade é elevada, tanto na existência como na ausência de tecido esplênico^{19,59,60}. A opção pelo rato *Wistar* se deveu a vários fatores, como facilidade em realizar o experimento e comparar com outras pesquisas, custo mais baixo e controle e manutenção mais fáceis desses animais, quando comparados com animais de porte maior⁶¹⁻⁶³.

Quando analisamos a sobrevida de ratos submetidos a diferentes tipos de procedimentos no baço - manipulação do baço, esplenectomia total, esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior - seguidos de indução de peritonite, observou-se que os animais do grupo ET tiveram menos tempo de vida que os animais dos outros dois grupos: os submetidos somente à MB e à ESTPI. Nos animais do grupo ESTPI, o tempo médio e mediano de sobrevida foi superior a 11 horas e, além de ter sido o maior entre os grupos de animais, foi o que apresentou variabilidade mais baixa e desvio-padrão menor. Embora o tempo de sobrevida dos animais do grupo MB tenha sido um pouco inferior, mais de nove horas, não houve diferença estatística entre eles, ou seja, comportamento semelhante entre os grupos que mantiveram o baço ou parte dele. Por outro lado, nos animais do grupo ET, o tempo de sobrevida foi de somente 3,8 horas, significativamente menor que nos outros dois grupos de animais e, ainda, a variabilidade e o desvio-padrão foram elevados e muito superiores aos dos demais grupos. Assim, considerando a chance de sobrevida dos animais em 10 horas, após a indução da peritonite foi de aproximadamente 10% no grupo ET, 40% no grupo MB e 72% nos animais do grupo ESTPI. Essa constatação está de acordo com a literatura, na qual o remanescente esplênico de esplenectomias subtotais ou os autoimplantes são capazes de manter a função imunológica do baço ou pelo menos parte dela, quando se faz necessária a remoção do órgão ou parte dele⁶⁴⁻⁷¹. Justifica-se, por isso, o empenho cada vez maior por parte dos cirurgiões na tentativa de preservar o tecido esplênico, por conhecer a sua importância na defesa

do organismo e por lidar com as consequências indesejáveis de uma esplenectomia naqueles pacientes cujas outras opções de tratamento são inviáveis.

O fato de os animais submetidos à esplenectomia total terem apresentado menor sobrevivência era esperado, já que a retirada de todo o baço implica a perda de um órgão com importante função imunológica. Ainda, os animais submetidos à peritonite apresentam seus mecanismos de defesa imunológica deprimidos, tornando-se mais suscetíveis à sepse e à morte mais precoce. Em pacientes asplênicos a infecção devastadora ocorre na maioria e com alto índice de mortalidade⁵¹.

Deve ser considerado, também, que há outras importantes funções desempenhadas pelo baço relacionadas à resposta imune, como a produção de imunomediadores, a properdina e tuftisina, que são opsoninas capazes de fazer ligação com bactérias, propiciando, assim, melhor defesa do organismo^{49,72-75}. Além disso, ele abriga a maior concentração de células do sistema imune⁷⁶.

Na ausência do baço, há diminuição dos seus níveis séricos, e essa perda é parcialmente responsável pelo aumento da suscetibilidade dos animais asplênicos às infecções agudas, por bactérias encapsuladas^{77,78}. Isso fortalece a indicação de que, sempre quando possível, o tecido esplênico deve ser preservado, total ou parcialmente, a fim de que ele cumpra a sua importante função imunológica, evitando-se, assim, a sepse e, conseqüentemente, o óbito dos animais.

Esperava-se que a preservação de todo o baço dos animais do grupo MB possibilitasse maior sobrevivência dos animais deste grupo em comparação aos animais dos outros dois grupos. Entretanto, isso não se concretizou, apesar de os resultados dos dois grupos de cirurgia conservadora terem sido semelhantes. Assim, pôde-se inferir que a ESTPI foi capaz de preservar a função imunológica dos animais.

As principais células que participam do sistema de defesa são os leucócitos, também chamados de glóbulos brancos do sangue, que são originados na medula óssea e são responsáveis pela destruição de corpos estranhos que invadem o organismo. Os linfócitos, por sua vez, são as células-chave no controle da resposta imune e compõem 20 a 30% dos leucócitos circulantes no sangue dos adultos. Divididos em linfócitos T e linfócitos B, são capazes de reconhecer especificamente os antígenos, diferenciando-os dos componentes próprios do organismo. Os linfócitos T ou células T (derivados do timo), apresentam-se em duas classes principais. Uma se diferencia e, quando ativada em células TCD8+ ou citotóxicas, são importantes no combate à infecção viral, uma vez que têm a capacidade de reconhecer e destruir

células infectadas por vírus. A outra classe de células T, chamadas de células TCD4+ ou auxiliares, atuam na ativação de outras células, como os linfócitos B e os macrófagos, além de exercerem papel central no controle e desenvolvimento da resposta imune.

A função imunológica dos animais foi avaliada por meio da quantificação das subpopulações de linfócitos TCD4 e TCD8, antes e após os procedimentos cirúrgicos no baço. Empregou-se a citometria de fluxo, uma vez que este exame é capaz de identificar os subtipos de células implicadas na imunidade. É importante ressaltar que, em pesquisas que visem descobrir ou interferir em vias de transdução de sinal de resposta imune e/ou inflamatória, a ferramenta que fornece a necessária sensibilidade e especificidade para monitorar subpopulações celulares é a citometria de fluxo⁷⁹. Esse procedimento é uma importante alternativa para o estudo dos eventos celulares envolvidos na resposta imunológica com aplicações clínicas subsequentes, pois uma das características desse instrumento é a manutenção das condições vitais da célula após sua manipulação, possibilitando investigações mais aprofundadas do comportamento biológico da população em estudo, inclusive de avaliação funcional^{80,81}.

Apesar da utilização mais comum ser a identificação de moléculas na superfície e interior das células, a citometria de fluxo pode ser aplicada em grande variedade de investigações. É uma técnica relativamente recente, que tem como principal vantagem a análise multiparamétrica de milhares de células, individualmente, em curto espaço de tempo, tornando-a uma técnica consistente e bastante confiável para detecção de parâmetros morfológicos, bioquímicos e fisiológicos de células individuais. A capacidade de mensurar simultaneamente múltiplos parâmetros em uma única célula é, provavelmente, o aspecto mais poderoso dessa técnica^{82,83}.

No presente estudo, ao comparar os resultados da contagem de linfócitos TCD4 e TCD8 antes e após os procedimentos no baço, verificou-se que nas duas modalidades de cirurgias conservadoras do tecido esplênico, grupo MB e grupo ESTPI, os resultados sugerem semelhanças por apresentarem o mesmo comportamento sobre a contagem desses linfócitos. Nesses dois grupos de animais houve significativa diminuição da contagem do número de linfócitos TCD8, na comparação com o grupo ET, no entanto, em relação à contagem de linfócitos TCD4, não houve diferença significativa entre os três grupos.

Uma explicação plausível para tal fato é que a diminuição da população de linfócitos TCD8 pode ser devida ao estresse cirúrgico e/ou à coleta de sangue, não se correlacionando aos procedimentos cirúrgicos estudados. O estresse é definido como uma resposta geral do corpo às ameaças internas ou externas inicialmente ameaçadoras, envolvendo a mobilização de recursos fisiológicos e psicológicos para lidar com eles. Em outras palavras, o estresse é caracterizado por um desequilíbrio entre as demandas do corpo e a capacidade do corpo de lidar com elas.

A partir de experimentos utilizando ratos, avaliaram o efeito do estresse de contenção na determinação do pool de leucócitos sanguíneos e na migração dos mesmos para pele e mucosas⁸⁵. Observou-se neutrofilia e diminuição do número de linfócitos B, monócitos, células NK e linfócitos T, logo nos primeiros minutos de contenção. Contudo, cessado o estresse, houve rápida reversão da alteração do número de leucócitos^{84,85}. Níveis moderados de cortisol, liberados durante o estresse agudo, induzem a redistribuição dos linfócitos, desviando-os do sangue para os tecidos mais susceptíveis a infecções⁸⁶. Induz ainda o deslocamento da produção de linfócitos T auxiliar (TCD4) Th1 para a Th2, propiciando um ambiente rico em citocinas anti-inflamatórias, linfócitos B e eosinófilos, e suprime a produção de citocinas inflamatórias e células TCD8⁸⁷.

Não se observou, também, correlação da sobrevivência dos animais nos três grupos submetidos à peritonite fecal com a população de linfócitos TCD4 e TCD8.

De acordo com a literatura, era de se esperar que após a esplenectomia a contagem de leucócitos no sangue, em especial os linfócitos, estivesse aumentada^{27,28}. Os linfócitos, especificamente, costumam aumentar em caso de infecção e sua quantidade serve como indicativo para diversas doenças, além de surgir após a esplenectomia. Entretanto, aqui não se detectou aumento do número de linfócitos no sangue, o que pode ter ocorrido devido ao tempo em que foi realizada a segunda coleta de sangue, ou seja, 70 dias após a esplenectomia. Esse tempo foi proposto no delineamento da pesquisa, por se considerar que o tecido esplênico poderia recuperar suas funções imunológicas após esse tempo, quando se realiza algum tipo de cirurgia no baço. Nesse período, no entanto, pode ter havido acomodação dos níveis desses linfócitos no sangue, pois oito semanas depois dos procedimentos no baço este órgão está com suas funções recuperadas, tanto na manipulação quanto na ESTPI.

Quanto à esplenectomia total, dados da literatura confirmam que leucocitose fisiológica é registrada após o quinto dia do procedimento, sendo o pico máximo após 10 dias, seguido pela redução gradual^{85,86}. Provavelmente o aumento do número de linfócitos no sangue não tenha sido referido na presente pesquisa, porque o tempo de 70 dias após as cirurgias sobre o baço, data da segunda coleta de sangue, tenha sido suficiente para que houvesse redistribuição desses linfócitos para outros órgãos.

Seria interessante que se fizessem estudos à posteriori em que se tratasse a peritonite nos animais com baço ou parte dele e analisar a sobrevivência. Estudos realizados em animais de experimentação mostraram que anestésicos locais como a bupivacaína 0,5% ou lidocaína a 2% foram eficazes em evitar o óbito em 100% dos animais com peritonite fecal⁵⁹.

Acreditamos que este estudo contribuiu para avançar no conhecimento sobre a importância do baço frente à infecção. No entanto, em novas investigações experimentais nessa linha é prudente acrescentar um grupo-controle sem algum tipo de procedimento no animal, para eliminar possíveis vieses encontrados neste estudo.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados desta pesquisa, pode-se afirmar que a ESTPI contribuiu para aumentar a sobrevivência dos ratos. Houve alteração do número de linfócitos TCD8 e não foi verificada correlação da sobrevivência com o número de linfócitos TCD4 e TCD8.

REFERÊNCIAS

1. Moore KL. Anatomia orientada para a prática clínica. 7. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014.
2. Alberti LR, Rocha RF, Caldeira DAM, Petroianu A. Análise de sobrevivência relacionada ao sexo, após esplenectomia, em modelo animal. Rev Bras Hematol Hemoter. June 2007; 29(2):119-122.
3. Borjaili ASD, Cerqueira BS, Silbermann JR, Rezende CF, Freire Júnior DD, Castello JS, *et al.* Phagocytic function of lower spleen pole and autogenous splenic implants in rats. Acta Cir Bras. Dec. 2014; 29(12):781-786.
4. Marques RG, Petroianu A, Oliveira MBN, Bernardo Filho M. Importância da preservação de tecido esplênico para a fagocitose bacteriana. Acta Cir Bras. 2002; 17(6):388-93.
5. Crosby WH. An historical sketch of splenic function and splenectomy. Lymphology. 1983; 16(2):52
6. King H, Shumacker Jr HB. Splenic studies. Ann Surg. 1952; 136(2):239-42.
7. Weledji EP. Benefits and risks of splenectomy. Int J Surg. 2014; 12(2):113-9.
8. Coldwell C, Hollingsworth A, Wilson CH. Spleen conserving surgery versus splenectomy for injured patients with splenic trauma. Cochrane Database Syst Rev. 2011; (Issue 3), art. nº: CD009042.
9. Duarte L, Pinho H, Marques C, Pinheiro LF. Prevenção da sépsis pós-esplenectomia: criação de um protocolo de vacinação e educação do doente esplenectomizado. Rev Port Cir. 2014; (31):9-18.
10. Ferreira A, Gut AL, Matsubara LS. Choque séptico. Rev Bras Clin Terap. 2002; 28(6):242-50.

11. Santos JCM, Levy CE. Tratamento das peritonites purulentas generalizadas usando, como terapêutica coadjuvante à associação de clindamicina com gentamicina. *Arq Bras Med.* 1987; 61:355-60.
12. Kaltàrentzos FE, Dougenis D, Cristopoulos DC, Spiliotis JD, Williams M, Androulakis J. Prognostic criteria in intra-abdominal sepsis. *Int Surg.* 1987; 72:185-87.
13. Wittmann DH. Intra-abdominal infections: Introduction. *World J Surg.* 1990; 14:145-47.
14. Oftenbart K, Bengmark S. Intra-abdominal infections and gut origin sepsis. *World J Surg.* 1990; 14:191-95.
15. Santos JCM, Levy CE, Reis CU. Comparative effectiveness of pefloxacin plus metronidazole and gentamicin plus metronidazole in the coadjuvant treatment of peritoneal infections. *Drug Invest.* 1994; 8:1-9.
16. Rogy M, Fugger R, Schemper M, Koss G, Schulz E. Unterschiedliche aussagekraft von zwei verschiedenen prognose-scores bei patienten mit peritonitis. *Chirurg.* 1990; 61:297- 300.
17. Bohnen J, Boulanger M, Meakins JL, McLean AP. Prognosis in generalized peritonitis: relation to cause and risk factors. *Arch Surg.* 1983; 118:285-90.
18. Koperna T, Schulz F. Prognosis and treatment of peritonitis. *Arch Surg.* 1996; 131:180-86.
19. Carneiro BGMC, Petroianu A, Rodrigues FHOC, Rocha RF. Estudo comparativo entre diversos tipos de tratamento para peritonite fecal em ratos. *Rev Col Bras Cir* 2001; 29:43-8.

20. Kreimer F, Aguiar JLA, Castro CMMB, Lacerda CM, Reis T, Lisboa JF. Resposta terapêutica e inflamatória de ratos com peritonite secundária submetidos ao uso tópico de ampicilina/sulbactam. *Acta Cir Bras.* 2005; 20:31-39.
21. Sands KE, Bates DW, Lancken PN, Graman PS, Hibberd PL, Kahn KL, *et al.* Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *JAMA.* 1997; 278: 234-40.
22. Mulier S, Penninckx F, Verwaest C, Filez L, Aerts R, Fieuws S, *et al.* Factors affecting mortality in generalized postoperative peritonitis: multivariate analysis in 96 patients. *World J Surg.* 2003; 27(4): 379-84.
23. Alberti LR, Rocha RF, Caldeira DA, Petroianu A. Post-splenectomy mortality in rats. *An Fac Med Univ Fed Pernamb.* 2006; 51(1):12-15.
24. Kestering DM, d'Acampora AJ, Farias DC, Brum SP, Ely JB. Rats resistance to fecal peritonitis when subjected to total splenectomy and auto-implant of the spleen in retroperitoneum. *Acta Cir Bras.* 2005; 20(6): 473-477.
25. Biondo-Simões MLP, Pante ML, Liberato CCG, Gauginski Júnior JC, Macedo VL, Dias C. Capacidade fagocitária de ratos esplenectomizados. *Acta Cir Bras.* 2000; 15(3): 17-20.
26. Witztum JL. Splenic immunity and atherosclerosis: a glimpse into a novel paradigm? *J Clin Invest.* 2002; 109(6):721-4.
27. Santana CC, Vassallo J, De Freitas LAR, Oliveira GGS, Pontes De Carvalho LC, Dos Santos WLC. Inflammation and structural changes of splenic lymphoid tissue in visceral leishmaniasis: a study on naturally infected dogs. *Parasite Immunol.* Oct. 2008; 30(10):515–24.
28. Mebius R, Kraal. G. Structure and function of the spleen. *Nature.* Aug. 2005; 5:607-616.

29. Cesta MF. Normal structure, function and histology of the spleen. *Toxicol Pathol.* 2006; 34:45,65.
30. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular*. 7. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
31. Peakman M, Vergani D. *Imunologia básica e clínica*. 2. ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
32. Floreano D, Mattiussi C. *Bio-inspired artificial intelligence: theories, methods, and technologies*. MIT press, Machassussetts, 2008.
33. Petroianu A. *O baço*. 1. ed., São Paulo: CLR Balieiro, 2003.
34. Massaioli N, Mainardi SM, Paron L, Redivo L, Rota Scalabrini D, Poccardi, G. Phenotypical characterization of lymphocyte recirculating subsets in patients undergoing splenectomy for trauma. *Ann Ital Chir.* 1990; 61(3):273-6.
35. Karakantza M, Theodorou GL, Mouzaki A, Theodori E, Vagianos C, Maniatis A. In vitro study of the long-term effects of post-traumatic splenectomy on cellular immunity. *Scand J Immunol.* 2004; 59(2):209-19.
36. Djaldetti M, Bergman M, Salman H, Cohen AM, Fibach E, Bessler H. On the mechanism of post-splenectomy leukocytosis in mice. *Eur J Clin Invest.* 2003; 33(9):811-7.
37. Horowitz J, Leonard D, Smith J, Brotman S. Postsplenectomy leukocytosis: physiologic or an indicator of infection? *Am Surg.* 1992; 58:387-90.
38. Bessler H, Bergman M, Salman H, Beilin B, Djaldetti M. The relationship between partial splenectomy and peripheral leukocyte count. *J Surg Res.* 2004; 122(1):49-53.

39. Seabrook TJ, Hein WR, Dudler L, Young AJ. Splenectomy selectively affects the distribution and mobility of the recirculating lymphocyte pool. *Blood*. 2000; 96(3): 1180-3.
40. Ferrante A, Drew PA, Kiroff GK, Zola H. Peripheral blood leukocyte subpopulations in patients splenectomized for trauma. *Clin Exp Immunol*. 1987; 70:158-63.
41. Sipka S Júnior, Brath E, Toth FF, Fabian A, Krizsan C, Barath S, *et al*. Distribution of peripheral blood cells in mice after splenectomy or autotransplantation. *Microsurgery*. 2006; 26:43-9.
42. Miko I, Brath E, Nemeth N, Toth FF, Sipka S, Kovacs J, *et al*. Hematological, hemorheological, immunological, and morphological studies of spleen autotransplantation in mice: preliminary results. *Microsurgery*. 2003; 23:483-8.
43. Paulo MSL, Paulo ICAL, Nunes TA, Lázaro da Silva A, Cintra LC, Paulo DNS. Effect of hyperbaric oxygen therapy in rats with subtotal splenectomy preserving the inferior pole. *Acta Cir Bras*. June 2011; 26(3):156-164.
44. Zanotti-Cavazzoni SL, Goldfarb RD. Animal models of sepsis. *Crit Care Clin*, 2009; 25: 703–719.
45. Petroianu A, Carneiro BGMC, Rodrigues FHO, Rocha RF. *cRev Col Bras Cir*. Apr. 2004; 31(2):90-94.
46. Di Sabatino A, Carsetti R, Corazza GR. Post-splenectomy and hyposplenic states. *Lancet*. 2011; 378: 86-97.
47. Okabayashi T, Hanazaki K. Overwhelming postsplenectomy infection syndrome in adults: A clinically preventable disease. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(2):176-9.
48. Petroianu A, Mirandal ME, Oliveira RG. *Blackbook cirurgia: doenças cirúrgicas do baço*. Belo Horizonte: Blackbook, p. 328-37, 2008.

49. Valle R, Murad I, Bataglia TV, Santos EQ. Lesão esplênica no trauma abdominal fechado: atendimento realizado no Hospital Universitário de Maringá. VI EPCC Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar, 27 a 30 de outubro de 2009.
50. Marques RG, Petroianu A. Infecção fulminante pós-esplenectomia. *Arq Gastroenterol.* 2003; 40:47-54.
51. Sheikha AK, Salih ZT, Kasnazan KH, Khoshnaw MK, Al-Maliki T, Al-Azraqi TA, *et al.* Prevention of overwhelming postsplenectomy infection in thalassemia patients by partial rather than total splenectomy. *Can J Surg.* 2007; 50(5):382-6.
52. Boey JH. Cavidade peritoneal'. *In: Way LW.* (ed). *Cirurgia: diagnóstico e tratamento.* 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 321-333, 1993.
53. Walker AP, Condon RE. Peritonite e abscessos intra-abdominais. *In: Schwartz SI.* (ed). *Princípios de cirurgia.* 5. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp. 1216-1242, 1991.
54. Wittmann DH, Schein M, Condon RE. Management of secondary peritonitis. *Ann Surg.* 1996; 224: 10-18.
55. Schein M, Saadia R, Decker G. Intraoperative peritoneal lavage. *Surg Gynecol Obstet.* 1988; 166:187-195.
56. Garrido AG, Figueiredo LFP, Silva MR. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. *Acta Cir Bras.* 2004; 19(2):82-8.
57. Marshall JC, Creery D. Pre-clinical models of sepsis. *Sepsis.* 1998; 2:187-97.
58. Yin K, Wilmanskil J, Wang C, Oui G, Tahamont ML. Compartmentalization of inflammatory cells in sepsis. *Inflammation.* 2000; 24(6):547-57.
59. Brocco MC, Paulo DN, Baptista JF, Carrareto AR, Azevedo TC, Silva AI. Effects of peritoneal lavage with bupivacaine on survive of mice with fecal peritonitis. *Rev Bras Anesthesiol.* 2008; 58(5):474-9,470-4.

60. Torres OJM, Macedo EL, Melo TCM, Costa JVG, Nunes PMS, Viana RMM, *et al.* Peritonite fecal em ratos: eficácia da lavagem da cavidade peritoneal com solução de cloreto de sódio a 0,9%. *Acta Cir Bras.* Apr. 1999; 14(2):00.
61. Czeczko NG, Tibet TC, Muniz JC. Experimental study of the presence of a Penrose drain at size of a colocolic anastomosis with and without peritonitis. *Acta Cir Bras.* 1992; 7:147-150.
62. Freire ANM, Kobata KM, Toledo MRF. Infecção peritoneal experimental em ratos. *Acta Cir Bras.* 1989; 4(Suppl):19-20.
63. Greca FH, Souza Filho ZA, Araújo CFR. Peritonite experimental em ratos: bloqueio da absorção transdiafragmática. *Acta Cir Bras.* 1994; 9:22-4.
64. Paulo ICAL, Paulo DNS, Silva AL, Foletto RM, Colnago GL, Vargas PM. Níveis de lípides plasmáticos em ratos submetidos a esplenectomia total, ligadura simultânea dos vasos esplênicos e esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior. *Rev Col Bras Cirurgiões.* 2005; 32(5):229-236. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0100-69912005000500003>.
65. Petroianu A. Esplenectomia subtotal e anastomose esplenorrenal proximal, para o tratamento da hipertensão portal. *Rev Bras Cir.* 1983; 73(2):101-4.
66. Petroianu A. Avaliação da função fagocitária em remanescentes de esplenectomia subtotal e autoimplante esplênico autógeno. *Rev Bras Hematol Hemoter.* Mar. 2003; 25(1):25-31. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842003000100005>.
67. Petroianu A. Cirurgias conservadoras do baço para tratamento da esplenomegalia por mielofibrose. *Rev Bras Hematol Hemoter.* Dec. 2002; 24(4):262-269. Available from: <https://doi.org/10.1590/S1516-84842002000400004>.
68. Petroianu A. Esplenectomia subtotal, preservando o polo superior do baço suprido pelos vasos esplenogástricos. *Rev Col Bras Cir.* 1994; 21(1):21-6.

69. Petroianu A, Silva KDA. Esplenectomia subtotal para tratamento do hipodesenvolvimento somático e sexual secundário à esplenomegalia. *Rev Col Bras Cir.* Ago. 2002; 29(4):209-212. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0100-69912002000400005>.
70. Petroianu A, Veloso DFM, Costa, GR, Alberti LR. Efeitos de operações sobre o baço no lipidograma de ratas. *Rev Assoc Med Bras.* Feb. 2006; 52(1):56-59. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0104-42302006000100024>.
71. Paulo ICAL, Paulo DNS, Ferrari TA, Azeredo TCV, Silva AL. O polo inferior do baço de ratos e a oxigenoterapia hiperbárica. *Rev Assoc Med Bras.* Fev. 2008; 54(1):77-81. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0104-42302008000100025>.
72. Balfanz JR, Nesbit ME, Javir C, Krivit W. Overwhelming sepsis following splenectomy for trauma. *J Pediatr.* 1976; 88: 458-60.
73. Ronchi JI, Ferreira DC, Rebolho EC. Avaliação das realizações de imunoprofilaxia em pacientes esplenectomizados em um Hospital de Curitiba. *Rev Med Paraná.* 2006; 64(2):23-6.
74. Krivit W. Overwhelming postsplenectomy infection. *Am J Hematol.* 1977; 2:193.
75. Zoli G. Splenic autotransplantation after splenectomy: tuftsin activity correlates with residual splenic function. *Br J Surg.* 1994; 81:716-8.
76. Nunes CCA, Nunes WV, Waechter FL, Lima LP. Trauma esplênico: valor do autotransplante. *Rev Méd Sta Casa.* 1994; 5:1038-1044.
77. Chu DZ, Nishioka K, El-Hagin T, Hopfer RL, Romsdahl MM. Effects of tuftsin on postsplenectomy sepsis. *Surgery.* 1984; 97:701-6.
78. Eichner ER. Splenic function: Normal, too much and too little. *Am J Med.* 1979; 66:311.

79. Du L, Grover A, Ramanan S, Litwin V. The evolution of guidelines for the validation of flow cytometric methods. *Int J Laborat Hematol*. 2015; 37:3-10.
80. Bacal NS, Faulhaber MHW. *Aplicação prática em citometria de fluxo*. São Paulo: Ateneu, 2003.
81. Centro Científico Conhecer. Goiânia: *Enciclopédia Biosfera*. v. 13, n. 23, 2016.
82. Bendall SC, Nolan GP, Roederer M, Chattopadhyay PK. A deep profiler's guide to cytometry. *Trends Immunol*. 2012; 33(7):323-332. Doi:10.1016/j.it.2012.02.010.
83. Fang Y, Ramasamy RP. Current and prospective methods for plant disease detection. *Biosensors*. 2015; 4:537-561.
84. DHABHAR, F.S. et al. Diurnal and acute stress-induced changes in distribution of peripheral blood leukocyte subpopulations. *Brain, Behavior and Immunity*. v.8, p.66-79, 1994
85. DHABHAR, F.S. et al. Effects of stress on immune cell distribution: dynamics and hormonal mechanisms. *Journal of Immunology*. v.154, p.5511-5527, 1995.
86. Sapolsky, R. M. (2002). *Endocrinology of the stress-response*. In J. B. Becker, SI M. Breedlove, D. Crews & M. M McCarthy (orgs.), *Behavioural Endocrinology* (pp. 409-450). Cambridge, MA: MIT Press.
87. Montoro, J., Mullol, J., Jáuregui, I., Dávila, I., Ferrer, M., Bartra, J., ... Valero, A. (2009). Stress and allergy. *Journal of Investigative Allergology and Clinical Immunology*, 19(Suppl 1), 40-47. Recuperado de <http://www.jiaci.org/issues/vol19s1/7>.
88. Rab MAE, Meerveld-Eggink A, van Velzen-Blad H, van Loon D, Rijkers GT, de Weerd O. Persistent changes in circulating white blood cell populations after splenectomy. *Int J Hematol*. 2018; 107(2):157-65.

89. Toutouzas KG, Velmahos GC, Kaminski A, Chan L, Demetriades D. Leukocytosis after posttraumatic splenectomy: a physiologic event or sign of sepsis? *Arch Surg.* 2002; 137:924-8.

90. Cunha BA. Infection in nonleukopenic compromised hosts (diabetes mellitus, sle, steroids, and asplenia) in critical care. *Infect Crit Care.* 1998; 14:263-82.

APÊNDICE E ANEXOS

Apêndice A - Ficha de Anotação dos Dados do Experimento

TÍTULO DO PROJETO: **INFLUÊNCIA DA MANUTENÇÃO DO TECIDO ESPLÊNICO NA SOBREVIDA E NOS LINFONODOS TCD4 E TCD8 DE RATOS SUBMETIDOS À PERITONITE FECAL**

GRUPO 1 – Laparotomia e manipulação do baço - 10 ratos

Identificação: _____

Peso do rato (g): _____

Data da operação: _____

Horário da operação: _____

GRUPO 2 - Esplenectomia total - 10 ratos.

Identificação: _____

Peso do rato (g): _____

Data da operação: _____

Horário da operação: _____

GRUPO 3 - Esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior do baço
- 10 ratos.

Identificação: _____

Peso do rato (g): _____

Data da operação: _____

Horário da operação: _____

Função Imunológica de todos os ratos:

Antes de serem submetidos às cirurgias:

GRUPO 1 - Rato 1 a) Linfócito TCD4 _____ b) CD8 _____.**GRUPO 2** - Rato 1 a) Linfócito TCD4 _____ b) CD8 _____.**GRUPO 3** - Rato 1 a) Linfócito TCD4 _____ b) CD8 _____.

Após 70 dias (depois dos procedimentos cirúrgicos):

GRUPO 1 - Rato 1 a) Linfócito TCD4 _____ b) CD8 _____.**GRUPO 2** - Rato 1 a) Linfócito TCD4 _____ b) CD8 _____.**GRUPO 3** - Rato 1 a) Linfócito TCD4 _____ b) CD8 _____.**Data e hora peritonite:****GRUPO 1** - Rato 1 _____.**GRUPO 2** - Rato 1 _____.**GRUPO 3** - Rato 1 _____.**Tempo decorrido da peritonite até o momento do óbito:****GRUPO 1** - Rato 1 _____.**GRUPO 2** - Rato 1 _____.**GRUPO 3** - Rato 1 _____.

Anexo A – Parecer ético da Comissão de Ética no Uso de Animais - UFMG**CEUA**
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Senhor(a) Professor(a) Tarcizo Afonso Nunes,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Efeito da peritonite em ratos submetidos às operações conservadoras de tecido esplênico., submetido a esta comissão pelo protocolo 275 / 2015, a CEUA decidiu **aprovar** a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 07/03/2016.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Horizonte, 08/03/2016.

Respeitosamente.

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes
Presidente da CEUA-UFMG

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Anexo B – Parecer ético do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) – UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo CEUA nº 205/2012**, relativo ao projeto intitulado "**Função fagocitária do pólo esplênico inferior e de implantes esplênicos autógenos em ratos**", que tem como responsável(is) **Tarcizo Afonso Nunes**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **10/10/2012**.

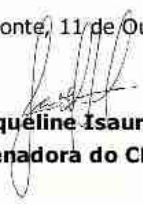
Este certificado expira-se em **10/10/ 2017**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol CEUA nº 205/2012**, related to the project entitled "**Phagocytic function of the lower splenic pole and autogenous splenic implants in rats**", under the supervisors of **Tarcizo Afonso Nunes**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **October 10 2012**.


This certificate expires in **October 10, 2017**.

Belo Horizonte, 11 de Outubro de 2012.


Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

Anexo C – Parecer ético do CEUA EMESCAM




EMESCAM
Tradição e Conhecimento em Saúde

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 001/2015, relativo ao projeto intitulado “**Efeito da Peritonite em Ratos Submetidos às Operações Conservadoras de Tecido Esplênico**”, que tem como responsável **Danilo Nagib Salomão Paulo** está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, Adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-EMESCAM), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 23/07/2015. Este certificado expira-se em 23/07/2020.

Certify that Protocol No 001/2015 concerning the project entitled “**Effect of Peritonitis in Rats Subjected to Fabric Spleen Conservative Operations**”, which is in charge **Danilo Nagib Salomão Paul** is according to the Ethical Principles of Animal Experimentation, Adopted by the Committee Ethics on Animal Use (CEUA-EMESCAM) and was approved at the regular meeting of 07.23.2015. This certificate expires on 07.23.2020.



Marcela Souza Lima Paulo
Coordenadora adjunta do CEUA-EMESCAM

