

VINÍCIUS RODRIGUES TARANTO NUNES

EFEITO DA LAVAGEM DA CAVIDADE PERITONEAL COM SOLUÇÕES
SALINAS A 0,9% E A 3% NA INJÚRIA PULMONAR PRECOCE DE GERBIS
COM PERITONITE INDUZIDA

Belo Horizonte

Minas Gerais - Brasil

2013

VINÍCIUS RODRIGUES TARANTO NUNES

EFEITO DA LAVAGEM DA CAVIDADE PERITONEAL COM SOLUÇÕES
SALINAS A 0,9% E A 3% NA INJÚRIA PULMONAR PRECOCE DE GERBIS
COM PERITONITE INDUZIDA

Dissertação 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 para a obtenção do grau de Mestre em Medicina.

Área de Concentração: Resposta Inflamatória à Agressão Tecidual

Linha de Pesquisa: Resposta Inflamatória no Choque Circulatório

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivana Duval de Araujo

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Calvão Barbuto

Faculdade de Medicina da UFMG
Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil

2013

VINÍCIUS RODRIGUES TARANTO NUNES

EFEITO DA LAVAGEM DA CAVIDADE PERITONEAL COM SOLUÇÕES SALINAS A
0,9% E A 3% NA INJÚRIA PULMONAR PRECOCE DE GERBIS COM PERITONITE
INDUZIDA

Dissertação apresentada e defendida à Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais para obtenção grau de Mestre em Medicina, perante Comissão Examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Dr. Antônio Lacerda Filho (Universidade Federal de Minas Gerais)

Prof. Dr. Cleber Dario Pinto Kruel (Universidade Federal do Rio Grande do Sul)

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ivana Duval de Araujo (Universidade Federal de Minas Gerais)

Co-orientador: Prof. Dr. Rafael Calvão Barbutto (Universidade Federal de Minas Gerais)

Aprovado em 12 de Agosto de 2013.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Prof. Dr. Clélio Campolina Diniz

VICE-REITORA: Prof^a. Dr^a. Rocksane de Carvalho Norton

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

PRÓ-REITOR DE PESQUISA: Prof. Dr. Renato de Lima dos Santos

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Prof. Dr. Francisco José Penna

VICE-DIRETOR: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha

SUBCOORDENADORA DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof^a. Dr^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA: Prof. Dr. Marcelo Eller Miranda

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA: Prof. Dr. Roberto Eustáquio Santos Guimarães

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA: Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

SUB-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA: Prof^a. Dr^a. Ivana Duval de Araujo

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Prof^a. Dr^a. Ivana Duval de Araujo

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Renato Santiago Gomez

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Sumara Marques Barral - representante discente

À Vânia, Alvimar, Natália e Natália,
razões do meu viver.

AGRADECIMENTOS

Considero esta uma seção muito importante deste trabalho científico, pois sozinhos não somos nada e, juntando-se os elos, formamos uma corrente.

Agradeço a Deus, pela fonte de toda vida e de tudo o que surgiu depois d'Ele.

À Prof^a. Dr^a. Ivana Duval de Araujo, por todo conhecimento compartilhado e pela oportunidade concedida.

Ao Prof. Dr. Rafael Calvão Barbuto, pelo companheirismo, atenção e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliari, pela paciente ajuda e acompanhamento na análise morfométrica.

À Prof^a. Dr^a. Paula Vieira Teixeira Vidigal, pelo tempo despendido na avaliação de lâminas, essencial à realização deste trabalho.

À minha mãe, Vânia Rodrigues Nunes, pelo exemplo constante do trabalho e dedicação; ao meu pai, Alvimar Taranto Nunes, pelo modelo de esforço e superação; à minha irmã, Natália Rodrigues Taranto Nunes, pela amizade e apoio incondicionais.

À Natália Barbosa Saad, por toda paciência, cumplicidade, compreensão, incentivo, companheirismo e amor eterno e incondicional em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. João Baptista de Rezende Neto, pela amizade e sugestões para a pesquisa.

Aos colegas Guilherme Nogueira Pena e Lucas Tourinho de Siqueira, pelos finais de semana despendidos nos experimentos.

À acadêmica Sílvia Lunardi Rocha, pela disponibilidade e interesse em todas as etapas do processo da pesquisa.

Aos preceptores da Coloproctologia do Hospital das Clínicas da UFMG, Prof^a. Magda Maria Profeta da Luz, Prof. Dr. Rodrigo Gomes da Silva, Prof. Dr. Antônio Lacerda Filho, Prof^a. Dr^a. Beatriz Deotti e Silva Rodrigues, Bernardo Hannan, Leonardo Maciel da Fonseca e aos colegas de residência Kelly Cristine de Lacerda Rodrigues Buzatti e Ana Carolina Parussolo André, pela paciência, compreensão e incentivo.

Ao Prof. Dr. Sérgio Alexandre da Conceição, pela paciente leitura e sugestões feitas a esta tese.

À Ivanilda Barbosa, pelas palavras de incentivo quando tudo parecia desmontar.

Ao Ricardo Gonçalves, pelo incentivo e ajuda com a apresentação e à Ilmar, pela atenciosa correção linguística da tese.

Aos meus professores do Promove, da UFMG e da residência médica que me ensinaram a valorizar o estudo e a pesquisa.

Aos pacientes que humildemente me ensinaram que Medicina se faz com atenção, cuidado e compromisso com o outro.

A todos os meus familiares e amigos que estiveram ao meu lado, em especial, ao Samuel Mendonça Mendes de Souza.

Aos animais sujeitos desta pesquisa, meu respeito por perderem suas vidas em prol do conhecimento.

"Determine that the thing can and shall be done, and then we shall find the way."

Abraham Lincoln

RESUMO

INTRODUÇÃO: A lavagem da cavidade peritoneal é amplamente difundida no tratamento da peritonite, no entanto alguns estudos questionam seu uso e demonstram que ela pode ser deletéria ao mesotélio. **OBJETIVO:** O presente estudo objetiva avaliar se a lavagem da cavidade peritoneal com soluções salinas a 0,9% e a 3% apresenta efeito na injúria pulmonar precoce em gerbis com peritonite induzida. **MATERIAIS E MÉTODO:** 34 gerbis machos foram distribuídos nos seguintes grupos: *Controle* (n=9), submetidos à laparotomia no tempo zero, relaparotomia após 2h, e sacrifício após um total de 6h; *Sem lavagem* (n=8), submetidos à indução de peritonite por ligadura e punção do ceco (LPC) no tempo zero, relaparotomia para secagem da cavidade e ressecção do segmento isquêmico após 2h, e sacrifício após um total de 6h; *Salina* (n=8), submetidos à indução de peritonite por ligadura e punção do ceco (LPC) no tempo zero, relaparotomia para lavagem da cavidade com solução salina morna a 0,9% e ressecção do segmento isquêmico após 2h, e sacrifício após um total de 6h; e *Hipertônico* (n=9), submetidos ao mesmo procedimento do grupo *salina*, porém utilizando solução salina a 3%. Após a eutanásia, foi coletado o pulmão esquerdo de cada animal para análise morfométrica. **RESULTADOS:** Nos grupos *salina* e *hipertônico*, houve redução significativa na contagem nuclear média no pulmão quando comparado ao grupo *sem lavagem* ($p < 0,01$). **CONCLUSÃO:** O presente estudo demonstrou que a lavagem da cavidade peritoneal com soluções salinas mornas a 0,9% e a 3% tem efeito benéfico na resposta inflamatória sistêmica precoce em gerbis sépticos, modulando e reduzindo a injúria pulmonar.

PALAVRAS CHAVE: Peritonite. Lavagem Peritoneal. Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica. Síndrome do Desconforto Respiratório do Adulto. Solução Salina Hipertônica. Cloreto de Sódio.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Peritoneal cavity lavage is widely spread in the treatment of peritonitis. Nonetheless, some studies question its rationale and prove it to be deleterious to the mesothelium. **OBJECTIVE:** The present study aims to determine whether 0.9% and 3% saline lavage of the peritoneal cavity has an effect on early lung injury of gerbils with induced peritonitis. **METHODOLOGY:** Thirty four male gerbils were divided into four groups: *Control* ($n=9$), submitted to laparotomy at time zero, re-laparotomy after 2 h, and sacrifice after a total of 6 hours from start; *Untreated* ($n=8$), submitted to peritonitis induction through cecal ligation and puncture (CLP) at time zero, re-laparotomy intended for drying of abdominal cavity and resection of the ischemic cecum after 2 h, and sacrifice after a total of 6 h from start; *Saline* ($n=8$), submitted to peritonitis induction through CLP at time zero, re-laparotomy intended for warm 0.9% saline lavage of the abdominal cavity and resection of the ischemic cecum after 2 h, and sacrifice after a total of 6 h from start; and *Hypertonic* ($n=9$), submitted to the same procedure as the saline group only using a 3% saline solution. After the sacrifice, we collected the left lung for morphometric analysis. **RESULTS:** In the *saline* and *hypertonic* group there was a significant decrease in the mean nuclei count in the lungs, when compared to the *untreated* group ($p<0,01$). **CONCLUSION:** The present study demonstrated that peritoneal lavage with warm 0.9% and 3% saline has a beneficial effect on the early systemic inflammatory response in septic gerbils, modulating and reducing the lung injury.

KEYWORDS: Peritonitis. Peritoneal Lavage. Systemic Inflammatory Response Syndrome. Adult Respiratory Distress Syndrome. Hypertonic Saline Solution. Sodium Chloride.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Técnica Operatória – Indução da Peritonite. A: Laparotomia mediana. B: Identificação do ceco. C: Ligadura da borda antimesentérica do ceco. D: Incisão na bolsa cecal.....	24
Figura 2: Técnica Operatória – Lavagem da Cavidade Peritoneal. A: Reabertura da cavidade peritoneal e identificação da bolsa cecal isquêmica (seta azul). B: Ressecção do tecido cecal isquêmico, mantendo-se a ligadura do ceco.....	25
Figura 3: Técnica Operatória – Lavagem da Cavidade Peritoneal. A: Lavagem da cavidade peritoneal com 10 mL da solução aquecida a 38° C. B: Secagem da cavidade peritoneal com gaze estéril.....	26
Figura 4 - Imagens digitalizadas do pulmão esquerdo (lente objetiva de 40X). Grupo “controle” mostrando arquitetura preservada.....	29
Figura 5 - Imagens digitalizadas do pulmão esquerdo (lente objetiva de 40X). Grupo “sem lavagem”, com destruição completa do parênquima, colapso alveolar, edema, espessamento da parede alveolar, infiltrado inflamatório polimorfonuclear e exsudato hemorrágico.....	30
Figura 6 - Imagens digitalizadas do pulmão esquerdo (lente objetiva de 40X). Grupo “salina” com congestão e infiltrado inflamatório moderado.....	30
Figura 7 - Imagens digitalizadas do pulmão esquerdo (lente objetiva de 40X). Grupo “hipertônico” com infiltrado inflamatório moderado.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Contagem nuclear em 30 campos aleatórios no pulmão esquerdo de animais do grupo controle.....	66
Tabela 2 – Contagem nuclear em 30 campos aleatórios no pulmão esquerdo de animais do grupo sem lavagem.....	67
Tabela 3 – Contagem nuclear em 30 campos aleatórios no pulmão esquerdo de animais do grupo salina.....	68
Tabela 4 – Contagem nuclear em 30 campos aleatórios no pulmão esquerdo de animais do grupo hipertônico.....	69

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Contagem nuclear média no pulmão, expressa como média \pm desvio-padrão.....	31
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

40X	Quarenta vezes
C	Controle
CD14	Cluster of differentiation 14
CETEA/UFMG	Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais
CLP	Cecal ligation and puncture
FM/UFMG	Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais
H	Hipertônico
ICAM1	Molécula de adesão intracelular 1
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IM	Intramuscular
IP	Intraperitoneal
LPC	Ligadura e punção do ceco
Ltda	Limitada
n	Número
P	Nível de significância
pH	Potencial hidrogeniônico
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
S	Salina
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório do adulto
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SL	Sem lavagem
SLU	Superintendência de Limpeza Urbana

SP	São Paulo
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VCAM 1	Molécula de adesão de células vasculares

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μm	Micrômetros
cm	Centímetros
g	Gramas
h	Horas
kg	Quilogramas
L	Litros
mg	Miligramas
mL	Mililitros
mm	Milímetros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 OBJETIVO.....	20
3 RELEVÂNCIA.....	21
4 MATERIAIS E MÉTODO.....	22
4.1 Animais utilizados e cuidados dispensados.....	22
4.2 Delineamento experimental.....	22
4.3 Anestesia e técnica operatória.....	23
4.3.1 Indução da peritonite.....	23
4.3.2 Lavagem da cavidade peritoneal.....	24
4.3.3 Necropsia.....	26
4.4 Análise morfométrica.....	27
4.5 Análise estatística.....	28
5 RESULTADOS.....	29
5.1 Mortalidade.....	29
5.2 Morfometria pulmonar.....	29
6 DISCUSSÃO.....	32
7 CONCLUSÃO.....	38
REFERÊNCIAS.....	39
APÊNDICE A - ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO E CARTA DE ACEITAÇÃO.....	44
APÊNDICE B - TABELAS DE MORFOMETRIA PULMONAR.....	66
ANEXO A - CERTIFICADO DO CETEA.....	70
ANEXO B – ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO.....	71
ANEXO C – FOLHA DE APROVAÇÃO.....	72

1 INTRODUÇÃO

O peritônio reage aos vários estímulos nocivos de forma relativamente uniforme, havendo uma complexa reação inflamatória locorregional e sistêmica. Quando ocorre a peritonite, a rápida proliferação bacteriana pode causar disfunção da resposta inflamatória, gerando translocação bacteriana, sepse, falência de órgãos vitais e morte¹.

Existem três mecanismos principais pelos quais o peritônio reage à infecção: rápida remoção de bactérias para a circulação sistêmica, destruição de bactérias pelo complexo mecanismo da cascata do complemento e fagocitose e contenção da infecção com formação de abscesso².

A reação de defesa do peritônio a um estímulo nocivo se inicia com a ativação do complemento, gerando opsonização dos microorganismos e fagocitose. Os mastócitos são células de primordial importância nessa fase inicial, devido à sua localização estratégica na membrana submesotelial e à sua habilidade em degranular e liberar substâncias vasoativas (histamina e prostaglandinas), complemento, citocinas e opsoninas³. As citocinas pró-inflamatórias, sobretudo o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e a interleucina 1 beta (IL-1 β), agem localmente (estroma, mesotélio e endotélio) e sistemicamente ao iniciar a cascata química e celular que caracteriza a resposta de fase aguda³. As células mesoteliais respondem ao estímulo do TNF- α e IL-1 β , produzindo altos níveis de interleucina 8 (IL-8), um potente quimiotático de neutrófilos polimorfonucleares (PMN), recrutando células fagocitárias para a cavidade peritoneal de forma a combater o agente nocivo³. Além disso, as células mesoteliais expressam a molécula de adesão intracelular 1 (ICAM 1) e a molécula de adesão de células vasculares 1 (VCAM 1) em sua membrana celular. Essas moléculas, cuja expressão se encontra aumentada durante a peritonite, permitem o acoplamento de neutrófilos e facilitam sua passagem da corrente sanguínea para a cavidade peritoneal⁴.

O resultado final da infiltração fagocitária e ativação do complemento é um ambiente intraperitoneal hostil, que pode levar a resultados antagônicos: da mesma forma como ocorre um ataque aos agentes patogênicos, pode haver dano ao peritônio⁴. Os radicais livres do oxigênio, por exemplo, podem destruir as bactérias, mas também podem ter efeito deletério sobre o mesotélio, e, em algumas circunstâncias, todo o mesotélio pode ser

lesado⁴. A modulação dessa resposta inflamatória local e, conseqüentemente, sistêmica é um dos principais objetivos no tratamento da peritonite, já que minimiza os efeitos deletérios e incrementa a defesa orgânica.

Estabelecido o processo infeccioso intra-abdominal, advém uma alteração na homeostase causada por mediadores celulares e humorais, citocinas inflamatórias e radicais livres de oxigênio, que passam à circulação e atingem diversos órgãos-alvos, causando lesões e disfunções nesses, caracterizando a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS)⁵. Um dos principais órgãos-alvos acometido é o pulmão, e a principal causa de mortalidade na sepse abdominal é a Síndrome do Desconforto Respiratório do Adulto (SDRA), na qual há aumento da permeabilidade capilar e alteração da função dos neutrófilos^{6,7,8,9}, causando dano tissular, por vezes irreversível.

Um dos métodos empregados no tratamento da peritonite, a lavagem peritoneal, é amplamente utilizado por cirurgiões e tem como finalidade a remoção de partículas que são potenciais focos de contaminação e que poderiam provocar persistência ou exacerbação do processo inflamatório peritoneal, além de reduzir as citocinas pró-inflamatórias na cavidade abdominal e, conseqüentemente, na circulação sistêmica¹⁰. Apesar de amplamente usada, a lavagem peritoneal não é consenso entre os cirurgiões. Muitas variáveis da técnica são realizadas de forma empírica (como os métodos de realização da lavagem, os fluidos, o volume utilizado, dentre outros) e as evidências sobre o assunto ainda são escassas, sendo dependente da experiência de cada cirurgião.

Um questionário aplicado na Inglaterra revelou que 97% dos cirurgiões são adeptos da lavagem, e tal prática é realizada até que o fluido aspirado esteja límpido, sem sinais de contaminantes, sendo a solução salina a 0,9% a mais comumente utilizada¹¹.

O tratamento adequado da sepse abdominal envolve pelo menos três pilares: antibiótico sistêmico, controle da fonte da infecção e retirada dos contaminantes grosseiros. No que se refere à lavagem da cavidade abdominal, várias pesquisas mostram resultados conflitantes e ainda não há consenso na literatura sobre o seu real papel. Já está comprovado o benefício da lavagem em situações em que há contaminação grosseira da cavidade^{4,10}, sendo esta utilizada para a limpeza do peritônio. No entanto, ainda permanecem dúvidas quanto à lavagem exaustiva da cavidade, quando não há resíduos macroscópicos, até que o efluente se torne límpido, por exemplo⁴. Alguns estudos propõem

que a lavagem peritoneal interfere nos mecanismos de defesa peritoneal, sendo nociva aos neutrófilos e mesotélio, além de reduzir o fluido que contém todas as citocinas envolvidas nos mecanismos de defesa local, tendo pouco efeito sobre os patógenos, uma vez que estes se aderem às células mesoteliais e invadem o espaço submesotelial^{4,12,13}. Outros autores sugerem que tal prática modula a resposta inflamatória (sobretudo nos compartimentos extra-abdominais) e reduz a lesão em órgãos-alvo, melhorando a sobrevida¹⁴.

O uso intravenoso de solução salina hipertônica é comprovadamente benéfico como parte do tratamento da síndrome de falência de múltiplos órgãos devido à peritonite^{15,16,17,18}. Shih *et al.*¹⁸ demonstraram que a aplicação de solução salina hipertônica intravenosa em animais foi capaz de gerar níveis reduzidos de óxido nítrico e interleucina 1 β no plasma, e de radicais livres de oxigênio em órgãos-alvo, além de prevenir a falência circulatória e reduzir a mortalidade e a disfunção de órgãos. Essa solução apresenta efeito imunomodulador, que se traduz na redução do edema das células endoteliais, alterando a velocidade de fluxo na microcirculação, o que melhora a perfusão periférica, além de reduzir a perda de líquidos para o interstício^{16,17}. Também parece inibir a ativação, adesão e transmigração de neutrófilos aos tecidos, com menor atividade oxidativa e menor liberação de radicais livres de oxigênio e citocinas pró-inflamatórias^{15,16}. Em animais com SDRA, a solução salina hipertônica se provou eficaz em reduzir a permeabilidade da membrana alvéolo-capilar e a infiltração de neutrófilos, atenuando assim a injúria pulmonar¹⁷. Não se sabe se tal efeito imunomodulador poderia também se estender ao uso tópico na lavagem da cavidade peritoneal, reduzindo a resposta inflamatória sistêmica e a lesão em órgãos-alvos.

2 OBJETIVO

Avaliar a injúria pulmonar precoce em gerbis com peritonite induzida após tratamento da cavidade peritoneal com soluções salinas a 0,9% e a 3%.

3 RELEVÂNCIA

A busca de tratamentos que minimizem a injúria pulmonar na sepse de origem abdominal é de grande importância devido à alta morbimortalidade do quadro. Busca-se ainda identificar formas de tratamento práticas e pouco onerosas capazes de atenuar a resposta inflamatória local e sistêmica vistas nesses pacientes.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Animais utilizados e cuidados dispensados

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) e aprovado com protocolo 186/2011 (Anexo A). O n amostral foi calculado a partir do desvio-padrão de 1,97 obtido por meio de dados relativos à peritonite induzida em gerbis, derivados de estudos prévios não publicados conduzidos em nosso laboratório de pesquisa experimental, aplicando nível de significância de 5% e teste de hipótese bicaudal com poder de 80%.

Foram estudados 34 gerbis machos, com 12 semanas de vida e pesando 75-90g. Os animais foram obtidos do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e acomodados no depósito de pequenos animais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (FM/UFMG) por pelo menos 15 dias antes da experimentação. Todos os animais foram acondicionados em caixas coletivas, com no máximo 10 animais por caixa, dimensão 20x30x45cm, de poliuretano com tampas de aço inoxidável, forradas com serragem de madeira branca e atóxica. O recipiente para água era graduado, de polietileno e atóxico. As caixas foram mantidas em ambiente seco, à temperatura ambiente, obedecendo a ciclos naturais dia-noite. Os animais tiveram livre acesso à água filtrada e à ração para roedores (Labina®, Purina) antes do experimento.

4.2 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos nos seguintes grupos experimentais:

Controle (n=9): Laparotomia exploradora na hora zero, nova laparotomia na segunda hora e sacrifício na sexta hora.

Sem lavagem (n=8): Laparotomia exploradora com ligadura e punção do ceco na hora zero, nova laparotomia com secagem da cavidade e ressecção do segmento de ceco isquêmico na segunda hora e sacrifício na sexta hora.

Salina (n=8): Laparotomia exploradora com ligadura e punção do ceco na hora zero, nova laparotomia com ressecção do segmento de ceco isquêmico e lavagem da cavidade com solução salina a 0,9% na segunda hora e sacrifício na sexta hora.

Hipertônico (n=9): Laparotomia exploradora com ligadura e punção do ceco na hora zero, nova laparotomia com ressecção do segmento de ceco isquêmico e lavagem da cavidade com solução salina a 3% na segunda hora e sacrifício na sexta hora.

4.3 Anestesia e técnica operatória

4.3.1 Indução da Peritonite

Os gerbis foram anestesiados com injeção intraperitoneal (IP) de uma solução de xilazina, 8mg/kg/dose (Schering-Plough, Cotia-SP) e quetamina, 60mg/kg/dose (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira-SP). Depois de alcançado o plano anestésico, os animais foram posicionados em placa de cortiça em decúbito dorsal e imobilizados através de contenção das patas e da cauda com fita adesiva. Foi realizada tonsura da parede abdominal anterior junto à linha mediana e antissepsia de toda a parede abdominal anterior com solução de clorexidina degermante a 2%, seguida da laparotomia mediana de dois cm de extensão e a diérese por planos. Nos grupos “sem lavagem”, “salina” e “hipertônico”, induziu-se a peritonite pelo método da ligadura e punção do ceco (LPC), que consiste na ligadura da borda antimesentérica do ceco, em topografia distal à junção ileocecal, com fio de Seda 5-0 e secção da bolsa cecal com tesoura, em uma extensão de dois mm (Figura 1). Em seguida, procedeu-se à laparorráfia em dois planos (musculoaponeurótico e cutâneo) com sutura em chuleio contínuo, utilizando fio de Nylon 4-0. No grupo “controle”, foi feita a laparotomia com a mesma técnica operatória, realizando-se, então, apenas o inventário da cavidade e a laparorráfia conforme descrito acima. Todos os animais foram novamente

aconicionados em caixas coletivas, permanecendo os animais de um mesmo grupo contidos na mesma caixa. A partir de então, os animais permaneciam com livre acesso apenas à água filtrada.

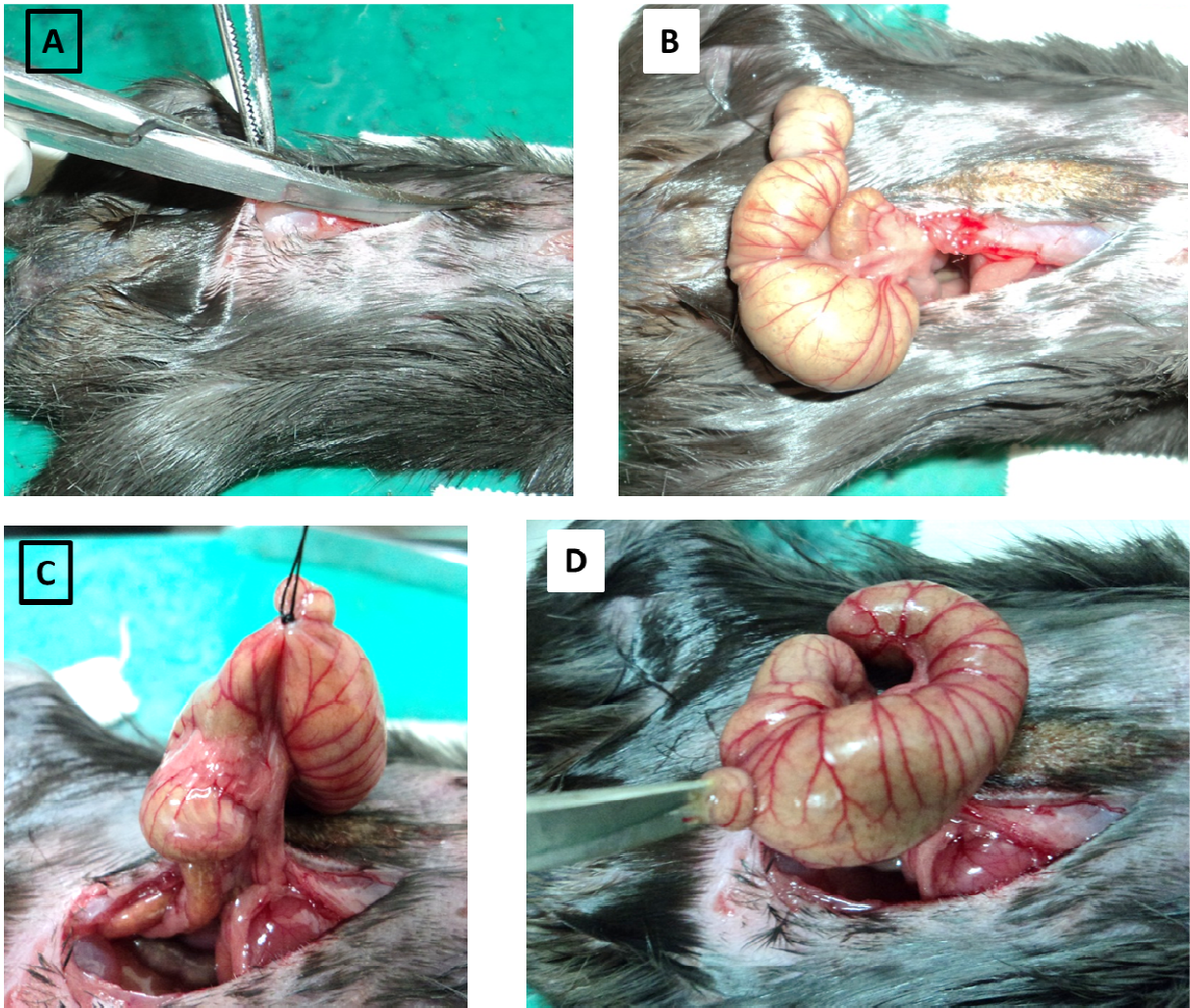


Figura 1: Técnica Operatória – Indução da Peritonite. A: Laparotomia mediana. B: Identificação do ceco. C: Ligadura da borda antimesentérica do ceco. D: Incisão na bolsa cecal.

4.3.2 Lavagem da Cavidade Peritoneal

Após duas horas da indução da peritonite, os animais foram novamente anestesiados, utilizando-se a mesma técnica descrita no item 4.3.1. Em seguida, a cavidade peritoneal foi reaberta e realizou-se a ressecção da bolsa cecal isquêmica (nos grupos em

que a mesma foi realizada) e o tratamento da cavidade peritoneal conforme cada grupo experimental (Figura 2).

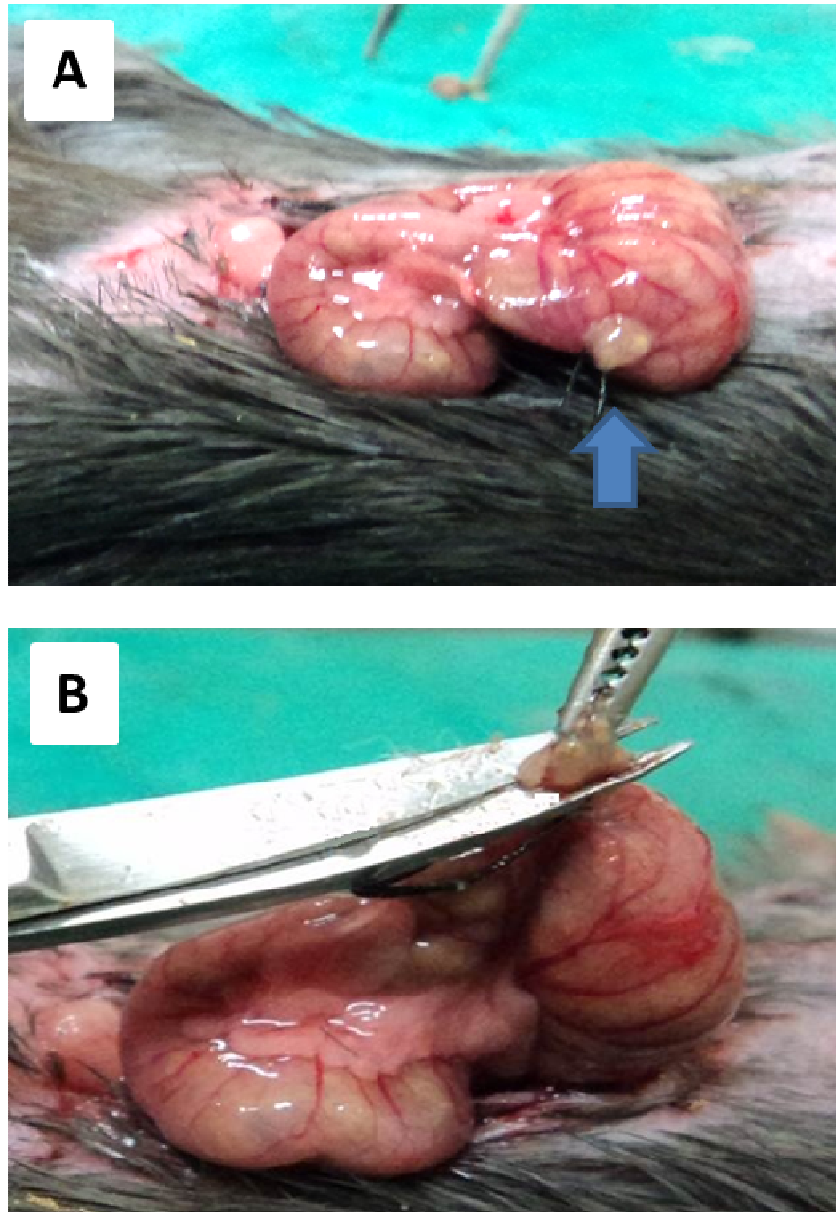


Figura 2: Técnica Operatória – Lavagem da Cavidade Peritoneal. A: Reabertura da cavidade peritoneal e identificação da bolsa cecal isquêmica (seta azul). B: Ressecção do tecido cecal isquêmico, mantendo-se a ligadura do ceco.

No grupo “salina” foi realizada a lavagem da cavidade peritoneal com 10 mL de solução aquecida (38°C) de cloreto de sódio a 0,9% por três vezes (a solução permaneceu em contato com a cavidade por cinco minutos em cada uma das três vezes), seguido da secagem

da cavidade com gaze estéril e síntese da parede abdominal conforme ítem 4.3.1 (Figura 3). No grupo “hipertônico” foi realizada a lavagem da cavidade peritoneal com 10 mL de solução aquecida (38°C) de cloreto de sódio a 3% por três vezes (totalizando 15 minutos de lavagem total), seguido da secagem da cavidade com gaze estéril e síntese da parede abdominal. No grupo “sem lavagem”, a cavidade foi apenas secada com gaze estéril e a laparotomia realizada conforme descrito no item 4.3.1. No grupo “controle”, foi realizado apenas o inventário da cavidade e a síntese da parede abdominal. Nos grupos “controle” e “sem lavagem”, a cavidade abdominal permaneceu aberta por 15 minutos, de forma a padronizar a duração da laparotomia aos grupos “salina” e “hipertônico”. Em todos os animais (inclusive no grupo “controle”) foi ministrada uma dose de 30mg/kg de Ceftriaxona (TRIAXIN®, Eurofarma, São Paulo-SP), por via intramuscular (IM), após a segunda operação.

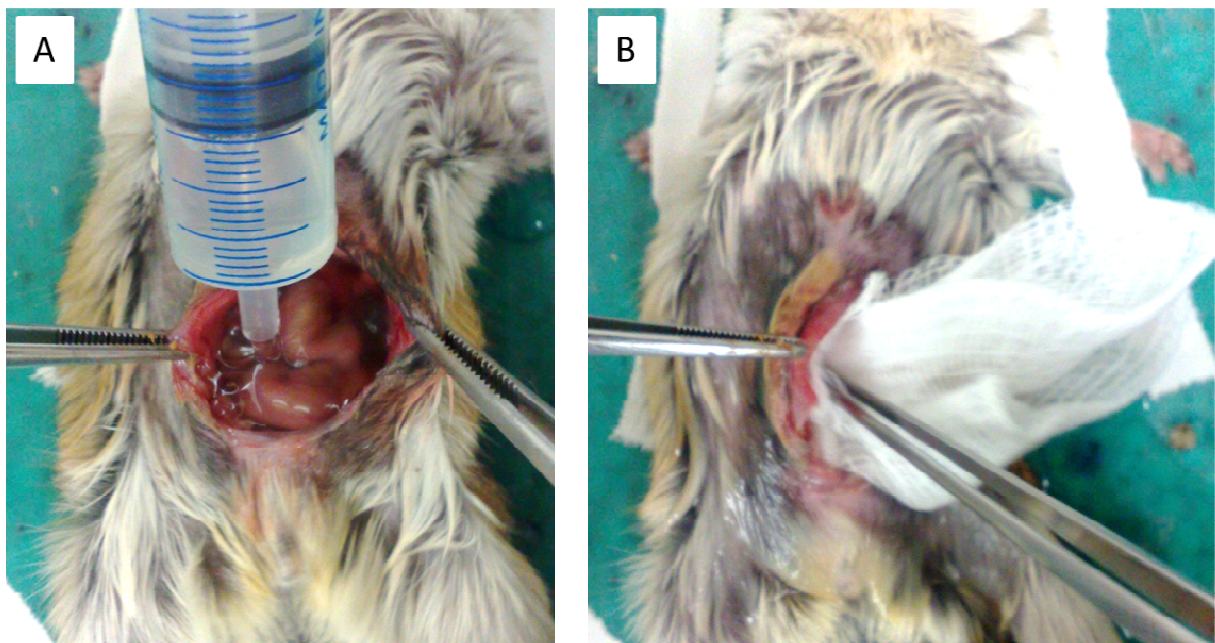


Figura 3: Técnica Operatória – Lavagem da Cavidade Peritoneal. A: Lavagem da cavidade peritoneal com 10 mL da solução aquecida a 38° C. B: Secagem da cavidade peritoneal com gaze estéril.

4.3.3 Necropsia

Após um período total de estudo de seis horas, os animais foram submetidos à eutanásia por sobredosagem de anestésico (200mg/kg quetamina + 25mg/kg xilazina, IP) e

realizada reabertura da cavidade abdominal estendida com esternotomia mediana, por meio da qual foi coletado o pulmão esquerdo de cada animal. Cada fragmento foi armazenado separadamente em um *ependorf* preenchido com solução de formol a 10%.

As carcaças desses animais foram armazenadas sob congelação em um congelador exclusivo para esse fim no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (FM/UFMG) e, posteriormente, encaminhadas à Divisão de Material Biológico e Hospitalar da Superintendência de Limpeza Urbana (SLU) de Belo Horizonte, órgão responsável pela coleta e tratamento de material biológico do município.

4.4 Análise Morfométrica

O fragmento de pulmão esquerdo foi incluso em parafina, sendo realizados cortes de 5,0 μm , corados com hematoxilina-eosina e preparados em lâminas de vidro.

A análise morfométrica do infiltrado inflamatório pulmonar foi realizada utilizando-se 10 capturas de imagem aleatórias em cada plano (superior, médio e inferior) do pulmão esquerdo, vistos com a lente objetiva de 40X e digitalizadas utilizando uma microcâmara (JVC TK-1270/RGB), totalizando uma área analisada de aproximadamente $1,6 \times 10^6 \mu\text{m}^2$.

Todas as células de cada imagem foram quantificadas utilizando o “software” KS300 do analisador Carl Zeiss Image Analyzer. Os núcleos dos leucócitos e das outras células presentes no tecido pulmonar foram contados por meio de seleção de pixel da imagem real e subsequentemente transformados em imagem binária para posterior análise. Para a análise final da morfometria pulmonar, os valores de contagem nuclear adquiridos em cada uma das imagens capturadas nos diferentes planos foram agrupados para determinar a contagem celular total do pulmão de cada animal. Esta análise foi realizada por um pesquisador encoberto aos grupos examinados. O resultado do número total de células por animal foi expresso em número de células $\times 10^3/30$ imagens analisadas. Para a análise final de cada grupo foram considerados os valores encontrados para cada animal e, posteriormente, calculadas a média e o desvio-padrão.

4.5 Análise estatística

Os resultados da análise morfométrica foram expressos como média \pm desvio padrão $\times 10^3$. Para a análise estatística, utilizou-se o programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 17.0 para Windows, SPSS Incorporation, Chicago, Illinois, Estados Unidos da América, 2008. Os dados quantitativos foram comparados entre os grupos (dois a dois) através do teste de Mann-Whitney, considerando-se significativos valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Mortalidade

Não houve mortalidade de animais em nenhum dos grupos analisados durante todo o experimento.

5.2 Morfometria pulmonar

No grupo “controle”, a média de núcleos somados em 30 campos aleatórios foi de $8,3 \pm 1,6 \times 10^3$ (Figura 4). No grupo “sem lavagem”, a contagem média de núcleos foi de $11,7 \pm 1,7 \times 10^3$ (Figura 5), com diferença significativa quando comparado ao grupo “controle” ($p=0,01$).

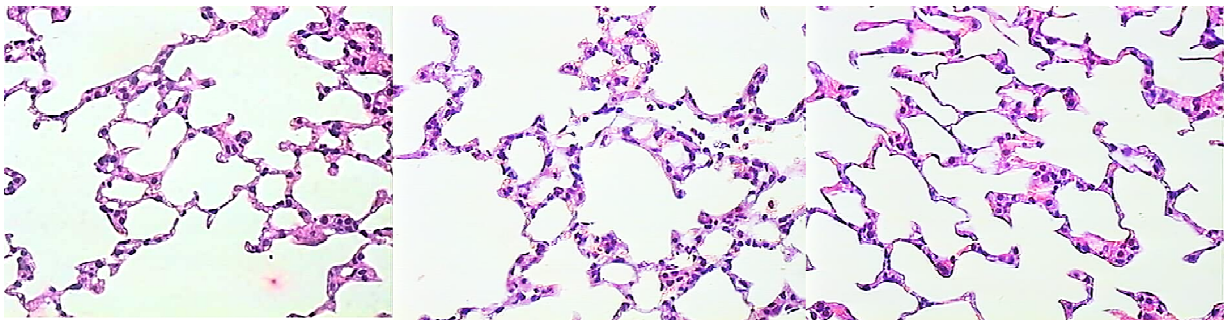


Figura 4 - Imagens digitalizadas do pulmão esquerdo (lente objetiva de 40X). Grupo “controle” mostrando arquitetura preservada.

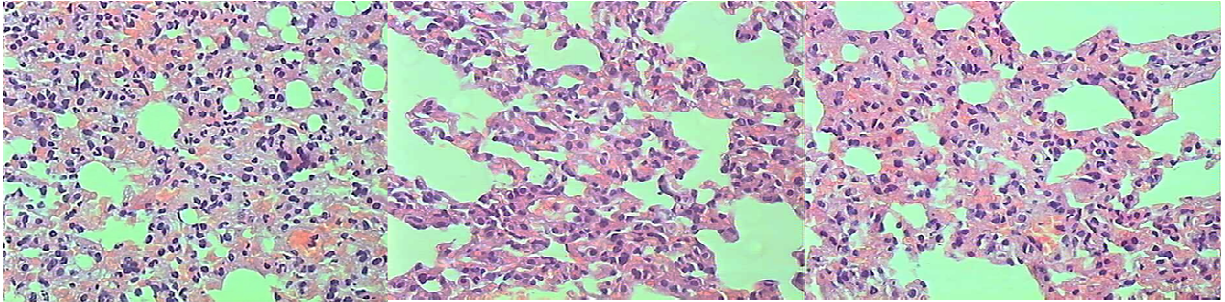


Figura 5 - Imagens digitalizadas do pulmão esquerdo (lente objetiva de 40X). Grupo “sem lavagem”, com destruição completa do parênquima, colapso alveolar, edema, espessamento da parede alveolar, infiltrado inflamatório polimorfonuclear e exsudato hemorrágico.

O grupo “salina” apresentou uma contagem nuclear média de $9,2 \pm 1,6 \times 10^3$ (Figura 6), apresentando diferença significativa quando comparado ao grupo “sem lavagem” ($p=0,003$), porém sem diferença significativa quando comparado ao grupo “controle” ($p>0,05$).

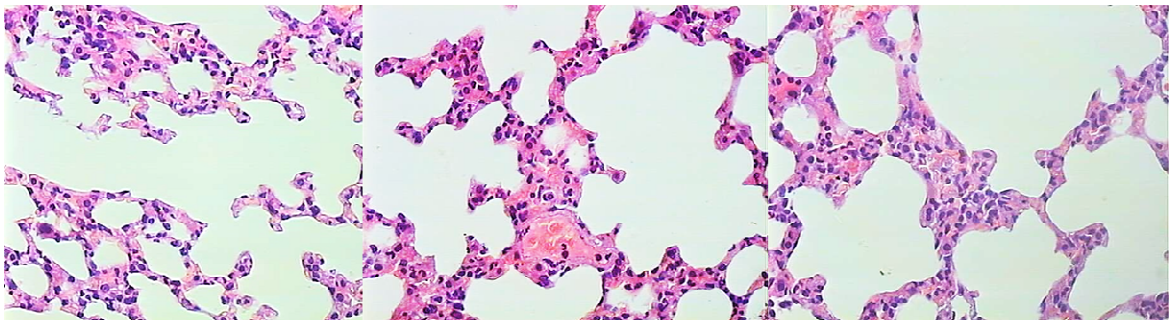


Figura 6 - Imagens digitalizadas do pulmão esquerdo (lente objetiva de 40X). Grupo “salina” com congestão e infiltrado inflamatório moderado.

O grupo “hipertônico” apresentou uma contagem média de núcleos de $9,2 \pm 1,3 \times 10^3$ (Figura 7), apresentando diferença significativa quando comparado ao grupo “sem lavagem” ($p=0,005$), porém sem diferença significativa quando comparado ao grupo “controle” ($p>0,05$).

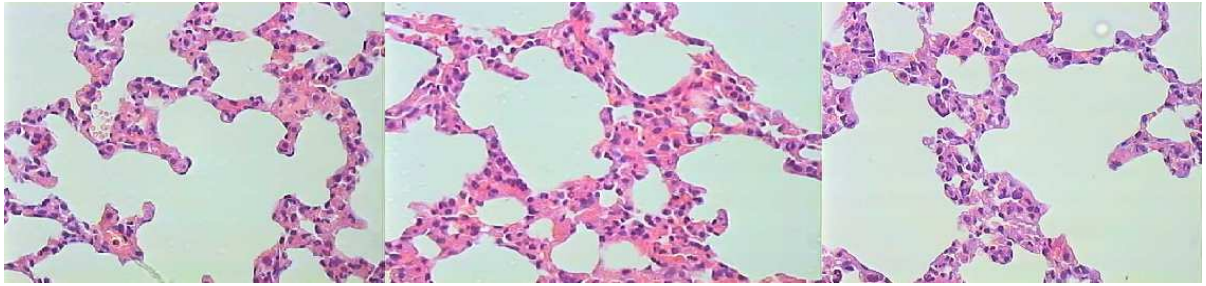


Figura 7 - Imagens digitalizadas do pulmão esquerdo (lente objetiva de 40X). Grupo “hipertônico” com infiltrado inflamatório moderado.

O grupo “hipertônico”, quando comparado ao grupo “salina”, não apresentou diferença significativa na contagem nuclear - $p > 0,05$ - (Gráfico 1).

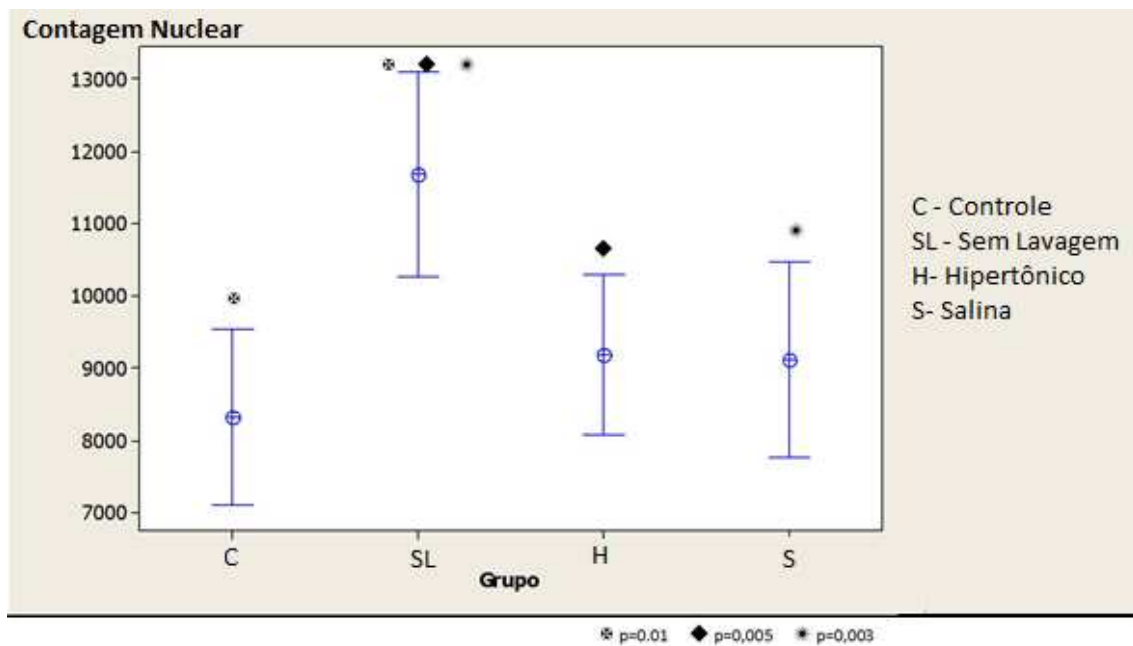


Gráfico 1 – Contagem nuclear média no pulmão, expressa como média \pm desvio-padrão.

6 DISCUSSÃO:

A cavidade peritoneal e suas células constitutivas (sobretudo o mesotélio) possuem papel primordial, que vai além de facilitar o deslizamento das superfícies peritoneais, sendo fundamental na resposta imune contra patógenos³. Quando há agressão à homeostase peritoneal (seja por agentes infecciosos^{1,3,14}, inflamatórios¹⁷ ou irritativos⁴), advém uma resposta local intrínseca e complexa, gerando a peritonite. As células mesoteliais e as células do sistema imune interagem gerando uma reação inflamatória local, seguida de resposta sistêmica⁴.

As repercussões sistêmicas da peritonite bacteriana secundária, como o choque séptico e a síndrome da falência múltipla de órgãos, ainda são importantes causas de morte na prática cirúrgica¹⁹. A fisiopatologia desse processo envolve não apenas a injúria local, mas também a lesão a órgãos-alvos, o que ocasiona um alto índice de mortalidade na sepse de foco abdominal. O pulmão é o órgão-alvo mais comumente afetado, estando acometido em cerca de 74% dos casos²⁰, e é frequentemente o primeiro a entrar em falência, tornando a injúria pulmonar uma das principais causas de óbito em pacientes com peritonite²¹. O acometimento sistêmico nesses casos decorre da presença de endotoxinas na circulação e da liberação maciça de citocinas pró-inflamatórias.

As endotoxinas são produzidas por bactérias Gram-negativas e agem como um dos principais mediadores da sepse e da falência de múltiplos órgãos na peritonite difusa. Ao se ligarem a receptores de membrana em monócitos e macrófagos, como o CD 14 ou receptor "Toll-like", desencadeiam a produção e liberação maciça de citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, o TNF- α , IL-1 e IL-6, além de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e IL-12, com predomínio das primeiras²². Além disso, aumentam a expressão de moléculas de adesão celular, como a ICAM-1, que é expressa no endotélio e ajuda a capturar os neutrófilos da circulação para migrarem aos tecidos inflamados. Há também superexpressão de enzimas como a óxido nítrico sintetase e a ciclooxigenase, com liberação sistêmica de radicais livres do oxigênio, gerando dano tecidual grave e, por vezes, irreversível^{23,24}.

Existem vários modelos experimentais para a indução da sepse, como a injeção de lipopolissacárides (intraperitoneal ou intravenoso), ligadura e punção do ceco, injeção intraperitoneal de bactérias, dentre outros. Desses, a ligadura e punção do ceco é o mais

comumente utilizado e difundido, devido ao alto índice de sucesso, reprodutibilidade, facilidade técnica e possibilidade de gerar uma peritonite controlada. Esse modelo cria um ambiente peritoneal semelhante ao que ocorre em situações de abdome agudo inflamatório, como na apendicite e diverticulite, ocorrendo contaminação da cavidade por uma microbiota mista do trato gastrointestinal na presença de tecido desvitalizado²⁵. Diversos estudos já provaram sua eficácia em reproduzir o modelo de sepse^{26,27}, manifestando todas as características cardinais da SIRS de forma precoce²⁸. No entanto, alguns autores não conseguiram provar que a ligadura e punção do ceco isoladamente é capaz de induzir injúria pulmonar²⁹. De fato, tal método apresenta algumas variabilidades, como o tamanho da incisão a ser realizada (no caso deste trabalho foi padronizado em dois mm), a extensão da laparotomia (fator que determina o componente de trauma tecidual), a quantidade de fezes remanescente na bolsa cecal (fator que determina o componente infeccioso da peritonite) e o tamanho da bolsa cecal (fator que determina o componente isquêmico da peritonite), razão provável pela qual há essa divergência na literatura^{30,31,32,33}. Este estudo demonstrou que a ligadura e punção do ceco utilizando tesoura foi capaz de induzir peritonite, sepse e injúria pulmonar de forma uniforme e controlada, o que foi comprovado pelo aumento de células no pulmão de animais sem tratamento.

O modelo experimental de ligadura e punção do ceco induz alterações hemodinâmicas, imunitárias, inflamatórias e bioquímicas semelhantes àquelas vistas na sepse em seres humanos, além de grande similaridade na morbidade, mortalidade e imunossupressão³⁴. No entanto, é importante notar que modelos animais não refletem completamente a fisiopatologia da sepse em seres humanos³⁵. Por isso, os resultados de trabalhos experimentais devem ser vistos com ressalvas antes da adoção de seus resultados para a prática clínica. Dentre algumas causas desta discrepância, pode-se citar a idade (usualmente se realiza estudos em animais jovens), a homogeneidade da amostra (peso, gênero, semelhança genética), o estado imunitário e nutricional adequado em modelos animais, além da ausência de comorbidades nesses, o controle ambiental e social (ausência de tabagismo, etilismo) e o tratamento em tempo padronizado e precoce da sepse em animais^{32,35}.

Doenças de caráter inflamatório e infeccioso podem causar aumento na atividade oxidativa dos pulmões, resultando na peroxidação da membrana basal e secreção de

citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos ativados, o que gera aumento na permeabilidade alvéolo-capilar e afluxo persistente de neutrófilos para os pulmões, culminando no estabelecimento da SDRA^{8,36}. A lesão pode ser resultado tanto de injúria direta (tóxica) ao parênquima pulmonar ou indiretamente (esta a principal responsável pelas anormalidades fisiológicas) como consequência da ativação de resposta inflamatória aguda, levando à liberação de produtos citotóxicos derivados de leucócitos, incluindo espécies reativas de oxigênio, enzimas proteolíticas, proteínas catiônicas, fatores de crescimento, eicosanoides e citocinas³⁷. A injúria pulmonar aguda precoce se caracteriza histologicamente por um infiltrado alveolar neutrofílico difuso, com hemorragia e edema pulmonar. As citocinas pró-inflamatórias produzidas perpetuam o processo inflamatório, gerando cada vez mais lesão alvéolo-capilar, o que exacerba o edema pulmonar e a atelectasia e, em última instância, gera hipoxemia⁷. Em torno de 50% dos casos de SDRA, há estímulo nocivo infeccioso, sendo o foco abdominal o mais comumente encontrado³⁸. Uma vez que todo o débito cardíaco passa pelo pulmão, e ele possui ampla rede capilar, não é de se estranhar que seja o principal órgão-alvo acometido na SIRS³⁹. Há comprovação em dados da literatura de que o infiltrado leucocitário pulmonar aumenta até atingir um platô com cinco horas após a indução da peritonite²¹. Logo, apesar de ser incomum uma abordagem cirúrgica tão precoce na prática clínica, o período de observação deste experimento é suficiente para avaliar a injúria pulmonar precoce após a peritonite secundária.

Nas últimas décadas, têm-se debatido muito a respeito do uso da lavagem peritoneal como tratamento adjuvante da peritonite secundária, e os resultados obtidos por vários autores não apontaram para um consenso^{10,12,14}. O primeiro cirurgião a propor uma abordagem cirúrgica na peritonite foi Mikulicz, em 1889⁴⁰. Ele definiu que a operação precoce, com eliminação do foco infeccioso e a lavagem da cavidade peritoneal poderiam interromper a cascata inflamatória e aumentar a sobrevida dos pacientes. Tais conceitos ainda fundamentam a base desse tratamento, e Seiler *et al.*⁴¹ demonstraram, em uma análise prospectiva de 258 pacientes com peritonite difusa, que 88% destes foram tratados com sucesso seguindo os preceitos de Mikulicz. Em seu estudo, Mikulicz não detalhou o mecanismo pelo qual os pacientes tratados com a lavagem peritoneal e contenção do foco apresentavam melhor sobrevida. Atualmente acredita-se que o principal mecanismo seja o clareamento e a neutralização das endotoxinas⁴¹.

A lavagem da cavidade peritoneal também tem efeitos comprovadamente negativos nos mecanismos de defesa do peritônio. Edmiston *et al.*¹² e Haagen *et al.*¹³ mostraram que as bactérias se aderem à membrana mesotelial e que a lavagem ocasiona apenas redução temporária de população bacteriana. Além disso, a lavagem também remove mediadores inflamatórios importantes na resposta local contra o agente agressor (por exemplo, proteínas de complemento, proteases, opsoninas e imunoglobulinas), afetando negativamente os mecanismos de defesa peritoneal⁴². A lavagem da cavidade parece retardar o processo de cicatrização das células mesoteliais lesadas e, em alguns casos, pode causar ainda mais lesão à membrana mesotelial^{10,43}. Entretanto, na maioria dos estudos, a lavagem da cavidade peritoneal mostrou ser capaz de reduzir a carga bacteriana e inibir sua proliferação, sendo mais eficaz do que não realizar tratamento algum da cavidade^{44,45}. O presente estudo corrobora os dados da literatura ao mostrar que a lavagem da cavidade é melhor do que o tratamento clínico exclusivo com uso de antibioticoterapia sistêmica.

Não há consenso quanto à melhor técnica de lavagem peritoneal, nem quanto à melhor solução a ser utilizada. Qadan *et al.*⁴⁴ conduziram uma metanálise que mostrou que o uso de antibióticos na solução de lavagem apresentou resultados favoráveis. Contudo, outros estudos não conseguiram provar o benefício do uso da lavagem com antimicrobianos, desde que a antibioticoterapia sistêmica fosse utilizada⁴⁶. Soluções com antissépticos (tais como iodopovidine ou clorexidina) e com diferentes valores de pH apresentaram resultados conflitantes em diferentes estudos^{1,10}. Soluções com anestésicos locais, como a lidocaína, a bupivacaína e a ropivacaína, parecem melhorar a sobrevida e a injúria pulmonar em animais com peritonite secundária^{47,48,49}. Sugimoto *et al.*⁵⁰ demonstraram que a lavagem da cavidade com grandes volumes de solução é mais eficaz do que com volumes menores. Esses autores utilizaram em média 25L para um adulto com peso estimado de 70kg, o que corresponde a uma razão de 0,36L/kg. No presente trabalho, usou-se 30mL para um animal de peso médio de 85g, atingindo uma razão de 0,35L/kg, semelhante à descrita por Sugimoto *et al.* e com eficácia terapêutica semelhante.

O uso da solução salina hipertônica a 7,5% por via intravenosa já foi estudado no tratamento da SIRS e da SDRA decorrente de diversas causas (pancreatite, isquemia-reperusão, choque hemorrágico, embolia gordurosa, peritonite)^{15,16,17,18}. Grande parte dos estudos com solução salina hipertônica intravenosa foi desenvolvida em modelos de choque

hipovolêmico e o benefício dessa solução, nesses casos, já está bem estabelecido, com efeito imunomodulador nos macrófagos alveolares, reduzindo a razão citocinas pró-inflamatórias / anti-inflamatórias^{51,52}, além de reduzir a infiltração de polimorfonucleares no pulmão⁵³ e a expressão de ICAM-1 em vasos pulmonares^{54,55}. O seu uso é seguro e, aparentemente, ajuda a modular a resposta inflamatória sistêmica ao reestabelecer o volume sanguíneo circulante, exercendo efeito benéfico na contratilidade cardíaca, pressão arterial, permeabilidade capilar e perfusão periférica¹⁷ e melhorando, assim, a sobrevivência⁵⁶. A solução salina a 3% intravenosa já foi testada no tratamento do edema cerebral causado por traumatismo cranioencefálico, tendo demonstrado efeito favorável nos parâmetros hemodinâmicos e na pressão intracraniana^{57,58}. Essa solução administrada por via venosa também já foi estudada em modelos de choque hemorrágico⁵⁹ e mostrou-se eficaz em elevar os valores de pressão arterial média, além de ter efeito imunomodulador, demonstrado pela redução nos valores de TNF- α e IL-6 plasmáticos e pela redução do escore histológico de injúria pulmonar⁶⁰. Após diversos estudos com o uso intravenoso da solução hipertônica, Shields *et al.*⁶¹ testaram o uso tópico de solução salina a 7,5% (por via intratraqueal) e provaram que mesmo quando usada localmente, esta foi capaz de reduzir a injúria pulmonar mediada por neutrófilos decorrente da pancreatite, diminuindo assim o risco do uso da terapia hipertônica sistêmica, como mielinólise pontina, por exemplo. O presente estudo investigou o uso da terapia hipertônica local como imunomoduladora no foco primário da sepse, tentando demonstrar que a modulação da resposta inflamatória no peritônio reduziria também a injúria pulmonar. Neste estudo, como se usou a solução na cavidade peritoneal, optou-se por usar a solução salina a 3% para reduzir a osmolaridade, com menor desidratação e distúrbios hidroeletrólíticos nos animais.

A lavagem com solução salina a 0,9% foi capaz de reduzir a contagem de núcleos no pulmão a valores semelhantes ao grupo controle, o que demonstra sua eficácia não apenas para conter, mas também para reverter a injúria pulmonar. Não foi comprovado benefício adicional com o uso de solução de cloreto de sódio a 3% quando comparado à solução salina a 0,9%, o que provavelmente indica que o efeito local da solução salina é meramente o de remoção mecânica dos contaminantes e clareamento das endotoxinas⁴⁵.

Este estudo apresenta algumas limitações. Apesar de o grupo “sem lavagem” apresentar maior contagem nuclear no pulmão, o que sugere uma resposta inflamatória

sistêmica, não foram medidos parâmetros hemodinâmicos que definem o choque séptico nos animais estudados. Além disso, não foi realizada ressuscitação volêmica nesses animais, o que seria um ponto crucial no tratamento da sepse. Não obstante, faz-se mister observar que o objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos precoces da peritonite. Logo, não se esperava a ocorrência de distúrbios metabólicos e alterações hemodinâmicas relevantes nesses animais, razão pela qual se optou por não realizar a ressuscitação volêmica. Acredita-se que, conseqüentemente, o efeito dessa terapêutica no resultado final do estudo foi anulada. Já foi demonstrado que não há absorção sistêmica de líquidos pela cavidade abdominal quando o peritônio se encontra inflamado⁶². Logo, nos animais dos grupos “salina” e “hipertônico”, que tiveram sua cavidade lavada, supõem-se não ter ocorrido ressuscitação volêmica decorrente do líquido infundido. Também é importante salientar que, na prática clínico-cirúrgica, é muito raro se tratar pacientes em uma fase tão precoce da sepse.

Em outros órgãos, também poderiam ocorrer alterações devido à sepse, porém optou-se pela análise apenas do pulmão por ser o primeiro órgão acometido e o mais comumente afetado, o que representa mais fidedignamente a resposta sistêmica.

Os resultados obtidos apontam para a eficiência da lavagem da cavidade peritoneal como meio de reduzir a injúria pulmonar na sepse abdominal. O estudo de diferentes concentrações de solução salina será objeto de investigações futuras, de forma a se determinar a concentração que gera menos resposta inflamatória sistêmica nos diferentes tempos de peritonite.

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a lavagem da cavidade peritoneal com soluções salinas mornas a 0,9% e a 3% tem efeito benéfico na injúria pulmonar precoce em gerbis sépticos. No entanto, não houve benefício no uso de solução salina hipertônica a 3% em relação ao uso da solução salina a 0,9%, não se comprovando o benefício adicional em termos de imunomodulação local da solução hipertônica.

REFERÊNCIAS

- 1 - Araujo ID, Grossi GCX, Diniz SOF, Nunes TA, Braga EA, Cardoso VN. Effects of the povidone-iodine (PVPI) in treatment of bacterial peritonitis induced in rats. *Acta Cir Bras.* 2010; 25(4): 322-7.
- 2 – Dunn DL, Barke RA, Knight NB, Humphrey EW, Simmons RL. Role of resident macrophages, peripheral neutrophils, and translymphatic absorption in bacterial clearance from peritoneal cavity. *Infect Immun.* 1985; 49(2): 257-64.
- 3 – Hall JC, Heel KA, Papadimitriou JM, Platell C. The pathobiology of peritonitis. *Gastroenterology.* 1998; 114: 185-96.
- 4 – Yao V, Platell C, Hall JC. Role of peritoneal mesothelial cells in peritonitis. *Br J Surg.* 2003; 90: 1187-94.
- 5 – Deitch EA. Multiple organ failure: Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg.* 1992; 216(2): 117-34.
- 6 – Tighe D, Moss R, Boghossian S, Heath MF, Chessum B, Bennett ED. Multi-organ damage resulting from experimental faecal peritonitis. *Clin Sci.* 1989; 76(3): 269-76.
- 7- Wheeler AP, Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *Lancet.* 2007; 369: 1553-65.
- 8- Anderson BO, Brown JM, Harken AH. Mechanisms of neutrophil-mediated tissue injury. *J Surg Res.* 1991; 51: 170-9.
- 9 – Goya T, Morisaki T, Torisu M. Immunologic assessment of host defense impairment in patients with septic multiple organ failure: relationship between complement activation and changes in neutrophil function. *Surgery.* 1994; 115: 145-55.
- 10 - Platell C, Papadimitriou JM, Hall JC. The influence of lavage on peritonitis. *J Am Coll Surg.* 2000; 191(6): 672-80.
- 11 - Whiteside OJH, Tytherleigh MG, Thrush S, Farouk R, Galland RB. Intra-operative peritoneal Lavage – Who does it and why? *Ann R Coll Surg Engl.* 2005; 87: 255-8.
- 12 - Edmiston CE Jr, Goheen MP, Kornhall S, Jones FE, Condon RE. Fecal peritonitis: microbial adherence to serosal mesothelium and resistance to peritoneal lavage. *World J Surg.* 1990; 14: 176–83.
- 13 - Haagen IA, Heezius HC, Verkooyen RP, Verhoef J, Verbrugh HA. Adherence of peritonitis-causing staphylococci to human peritoneal mesothelial cell monolayers. *J Infect Dis.* 1990; 161: 266–73.

- 14 - van Till JWO, Lamme B, van Esch TJH, van der Poll T, van Gulik TM, Boermeester MA. Surgical therapy attenuates abdominal and extra-abdominal inflammation in experimental peritonitis. *Eur Surg Res.* 2006; 38(2): 76-82.
- 15- Kennedy MT, Higgins BD, Costello JF, Curtin WA, Laffey JG. Hypertonic saline reduces inflammation and enhances the resolution of oleic acid induced acute lung injury. *BMC Pulm Med.* 2008; 8: 9-15.
- 16- Shields CJ, Winter DC, Manning BJ, Wang JH, Kirwan WO, Redmond HP. Hypertonic saline infusion for pulmonary injury due to ischemia-reperfusion. *Arch Surg.* 2003; 138: 9-14.
- 17 – Shields CJ, Winter DC, Sookhai S, Ryan L, Kirwan WO, Redmond HP. Hypertonic saline attenuates end-organ damage in an experimental model of acute pancreatitis. *Br J Surg.* 2000; 87: 1336-40.
- 18- Shih CC, Chen SJ, Chen A, Wu JY, Liaw WJ, Wu CC. Therapeutic effects of hypertonic saline on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *Crit Care Med.* 2008; 36(6): 1864-72.
- 19 - Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 1980; 29: 189-201.
- 20 - Vincent JL, Puri VK, Carlson RW, Weil MH. Acute respiratory failure in patients with generalized peritonitis. *Resuscitation.* 1983; 10(4): 283-90.
- 21 - Fukatsu K, Saito H, Han I, Inoue T, Furukawa S, Matsuda T, et al. Concomitant increase in neutrophil adhesion to inflammatory peritoneum and remote organs during peritonitis. *J Surg Res.* 1999; 81: 156-63.
- 22 – Dellinger RP. Inflammation and coagulation: implications for the septic patient. *Clin Infect Dis.* 2003; 36: 1259-65.
- 23 – Benjamim CF. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. *Medicina.* 2001; 34: 18-26.
- 24 – van der Poll T, van Deventer SJH. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin Am.* 1999; 13(2): 413-26.
- 25 – Poli-de-Figueiredo LF, Garrido AG, Nakagawa N, Sannomiya P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock.* 2008; 30: 53-9.
- 26 – Mutlak H, Jennewein C, Tran N, Mehring M, Latsch K, Habeck K, et al. Cecum ligation and dissection: a novel modified mouse sepsis model. *J Surg Res.* 2013. doi: 10.1016/j.jss.2012.11.046. [Epub ahead of print]
- 27 – Rittirsch D, Hoesel M, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol.* 2007; 81: 137-43.

- 28 – Brooks HF, Osabutey CK, Moss RF, Andrews PL, Davies DC. Caecal ligation and puncture in the rats mimics the pathophysiological changes in human sepsis and causes multi-organ dysfunction. *Metab Brain Dis.* 2007; 22: 353-73.
- 29- Iskander KN, Craciun FL, Stepien DM, Duffy ER, Kim J, Moitra R, et al. Cecal ligation and puncture-induced murine sepsis does not cause lung injury. *Crit Care Med.* 2013; 41: 159-70.
- 30 – Garrido A, Figueiredo LFP, Rocha e Silva M. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. *Acta Cir Bras.* 2004; 19(2): 82-8.
- 31 –Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flier IM, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc.* 2009; 4(1): 31-6.
- 32 – Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol.* 2011; 19(4): 198-208.
- 33- Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW 3rd, Bland KI, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock.* 2005; 24: 52-7.
- 34- Dyson A, Singer M. Animal models of sepsis: why does preclinical efficacy fail to translate to the clinical setting? *Crit Care Med.* 2009; 37: S30-S37.
- 35- Esmon CT. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med.* 2004; 32: S219-S222.
- 36 - Mercer-Jones MA, Heinzelmann M, Peyton JC, Wickel DJ, Cook M, Cheadle WG. The pulmonary inflammatory response to experimental fecal peritonitis: relative roles of tumor necrosis factor-alpha and endotoxin. *Inflammation.* 1997; 21(4): 401-17.
- 37 – Downey GP, Dong Q, Kruger J, Dedhar S, Cherapanov V. Regulation of neutrophil activations in acute lung injury. *Chest.* 1999; 116: S46-S54.
- 38 – Runcie C, Ramsay G. Intraabdominal infection: pulmonary failure. *World J Surg.* 1990; 14: 196-203.
- 39 – Malmros C, Holst E, Hansson L, Mårtensson L, Thörne J. Dynamic accumulation of neutrophils in lungs and visceral organs during early abdominal sepsis in the pig. *World J Surg.* 1994; 18: 811-7.
- 40- Mikulicz J. Weitere Erfahrungen über die operative behandlung der perforationsperitonitis. *Arch Klin Chir (Berl).* 1889; 39: 756-84.
- 41 – Seiler CA, Brügger L, Forssmann U, Baer HU, Büchler MW. Conservative surgical treatment of diffuse peritonitis. *Surgery.* 2000; 127(2): 178-84.

- 42 – Dunn DL, Barke RA, Ahrenholz DH, Humphrey EW, Simmons RL. The adjuvant effect of peritoneal fluid in experimental peritonitis: mechanisms and clinical implications. *Ann Surg.* 1984; 199: 37-43.
- 43 – Yao V, Platell C, Hall JC. Lavage enhances the production of proinflammatory mediators by peritoneal mesothelial cells in an experimental model. *Dis Colon Rectum.* 2005; 48(3): 560-6.
- 44 - Qadan M, Dajani D, Dickinson A, Polk HC Jr. Meta-analysis of the effect of peritoneal lavage on survival in experimental peritonitis. *Br J Surg.* 2010; 97: 151-9.
- 45- 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.* 1999; 14(2): 65-8.
- 46- Kreimer F, Aguiar JLA, Castro CMMB, Lacerda CM, Reis T, Lisboa Júnior F. Resposta terapêutica e inflamatória de ratos com peritonite secundária submetidos ao uso tópico de ampicilina/sulbactam. *Acta Cir Bras.* 2005; 20(S1): 31-9.
- 47 - Brocco MC, Paulo DNS, Baptista JFA, Ferrari TA, Azevedo TC, Silva AL. Effects of peritoneal lavage with lidocaine on survival of rats with fecal peritonitis. *Acta Cir Bras.* 2008; 23(1): 42-7.
- 48- Brocco MC, Gomez RS, Paulo DNS, Almeida CE, Baptista JF. Histological features of peritoneal lavage with ropivacaine in rats with fecal peritonitis. *Acta Bras Cir.* 2012; 27: 193-9.
- 49 – Brocco MC, Paulo DNS, Baptista JFA, Carraretto AR, Ferrari TA, Azevedo TC, et al. Efeito da lavagem peritoneal com bupivacaína na sobrevida de ratos com peritonite fecal. *Rev Bras Anesthesiol.* 2008; 58: 470-9.
- 50 - Sugimoto K, Hirata M, Kikuno T, Takishima T, Maekawa K, Ohwada T. Large-volume intraoperative peritoneal lavage with an assistant device for treatment of peritonitis caused by blunt traumatic rupture of the small bowel. *J Trauma.* 1995; 39: 689–92.
- 51 – Powers KA, Woo J, Khadaroo RG, Papia G, Kapus A, Rotstein OD. Hypertonic resuscitation of hemorrhagic shock upregulates the anti-inflammatory response by alveolar macrophages. *Surgery.* 2003; 134: 312-8.
- 52 – Shields CJ, O’Sullivan AW, Wang JH, Winter DC, Kirwan WO, Redmond HP. Hypertonic saline enhances host response to bacterial challenge by augmenting receptor-independent neutrophil intracellular superoxide formation. *Ann Surg.* 2003; 238: 249 –57.
- 53- Fernandes TR, Pontieri V, Moretti AI, Teixeira DO, Abatepaulo F, Soriano FG, et al. Hypertonic saline solution increases the expression of heat shock protein 70 and improves lung inflammation early after reperfusion in a rodent model of controlled hemorrhage. *Shock.* 2007; 27: 172-8.

- 54 – Yada-Langui MM, Anjos-Valotta EA, Sannomiya P, Rocha e Silva M, Coimbra R. Resuscitation affects microcirculatory polymorphonuclear leukocyte behavior after hemorrhagic shock: role of hypertonic saline and pentoxifylline. *Exp Biol Med.* 2004; 229: 684–93.
- 55- Rizoli SB, Kapus A, Fan J, Li YH, Marshall JC, Rotstein OD. Immunomodulatory effects of hypertonic resuscitation on the development of lung inflammation following hemorrhagic shock. *J Immunol.* 1998; 161; 6288-96.
- 56 - Coimbra R, Hoyt DB, Junger WG, Angle N, Wolf P, Loomis W, et al. Hypertonic saline resuscitation decreases susceptibility to sepsis after hemorrhagic shock. *J Trauma.* 1997; 42: 602-6.
- 57 – Qureshi AI, Suarez JI. Use of hypertonic saline solutions in treatment of cerebral edema and intracranial hypertension. *Crit Care Med.* 2000; 28: 3301-13.
- 58- Jiang W, Cao WJ, Zhang YK, Wei XY, Kuang F. Bolus injection of hypertonic solutions for cerebral edema in rats: challenge of homeostasis of healthy brain. *Neurosci Lett.* 2012; 509(1): 44-9.
- 59 – Coimbra R. 3% and 5% hypertonic saline. *J Trauma.* 2011; 70(5 Suppl): S25-6.
- 60- Vincenzi R, Cepeda LA, Pirani WM, Sannomyia P, Rocha-E-Silva M, Cruz RJ Jr. Small volume resuscitation with 3% hypertonic saline solution decrease inflammatory response and attenuates end organ damage after controlled hemorrhagic shock. *Am J Surg.* 2009; 198(3) :407-14.
- 61 – Shields CJ, Sookhai S, Winter DC, Dowdall JF, Kingston G, Parfrey N, et al. Attenuation of pancreatitis-induced pulmonary injury by aerosolized hypertonic saline. *Surg Infect.* 2001; 2: 215-24.
- 62- Scheingraber S, Boehme J, Scharbert G, Dralle H. Monitoring of acid-base and regulating variables during abdominal lavage. *Anaesth Intensive Care.* 2004; 32: 637-43.

APÊNDICE A - ARTIGO PARA PUBLICAÇÃO E CARTA DE ACEITAÇÃO

Surgical Infections

SURGICAL INFECTIONS

Surgical Infections Manuscript Central: <http://mc.manuscriptcentral.com/surgicalinfections>

EFFECT OF PERITONEAL CAVITY LAVAGE WITH 0.9% AND 3% SALINE SOLUTION IN THE LUNG AND SPLEEN OF GERBILS WITH INDUCED PERITONITIS

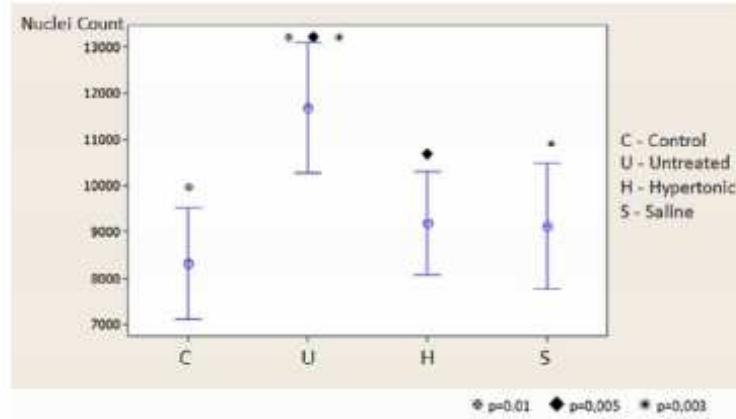
Journal:	<i>Surgical Infections</i>
Manuscript ID:	SUR-2013-019.R2
Manuscript Type:	Original Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Nunes, Vinicius; Universidade Federal de Minas Gerais, Surgery Department Barbuto, Rafael; Universidade Federal de Minas Gerais, Surgery Department VIDIGAL, PAULA; Universidade Federal de Minas Gerais, Surgery Department PENA, GUILHERME; Universidade Federal de Minas Gerais, Surgery Department ROCHA, SILVIA; Universidade Federal de Minas Gerais, Surgery Department SIQUEIRA, LUCAS; Universidade Federal de Minas Gerais, Surgery Department CALIARI, MARCELO; Universidade Federal de Minas Gerais, Surgery Department ARAUJO, IVANA; Universidade Federal de Minas Gerais, Surgery Department
Keyword:	Abdominal infection, Peritonitis, Pneumonia, Secondary Peritonitis, Septic Shock

SCHOLARONE™
Manuscripts

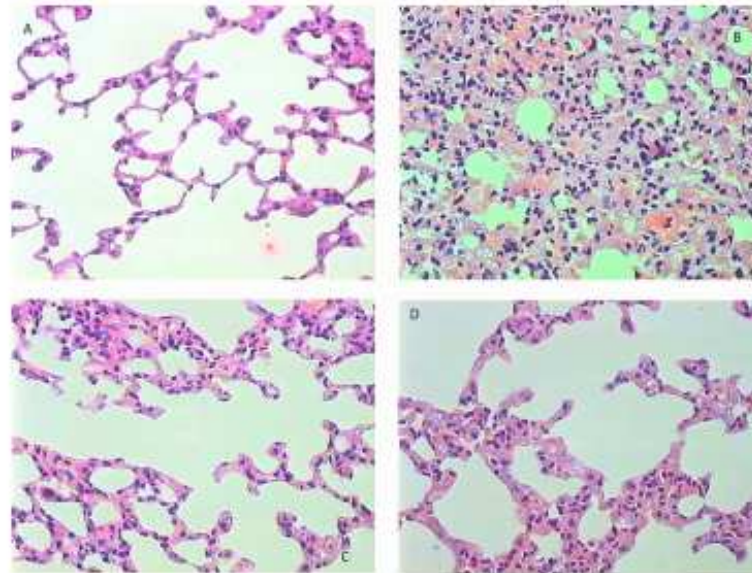
Mary Ann Liebert Inc., 140 Huguenot Street, New Rochelle, NY 10801

Surgical Infections

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60



Lung nuclei count expressed as mean \pm Standard Deviation.
264x155mm (96 x 96 DPI)



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Digitalized image of the left lung (40× objective lens). A – Control group displaying normal architecture; B – Untreated group (massive destruction of parenchyma with alveolar collapse, edema, thickening of the alveolar wall, polymorphonuclear cellular infiltration, and hemorrhagic exudate); C – Saline group; D – Hypertonic group. Both C and D present congestion and moderate inflammatory infiltration.
529x400mm (96 x 96 DPI)

Surgical Infections

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

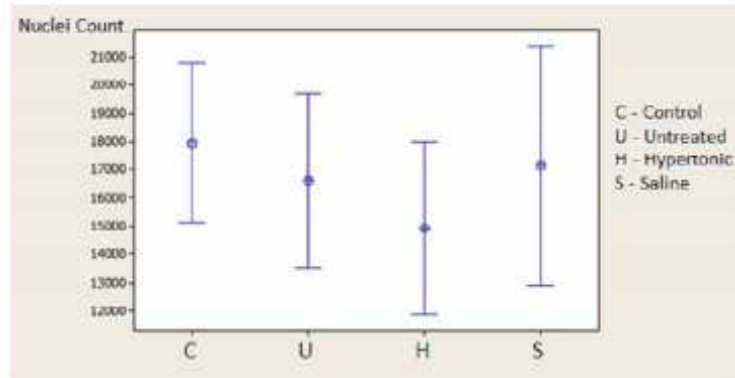


Fig. 3 - Spleen nuclei count expressed as mean + Standard Deviation.
264x136mm (96 x 96 DPI)

NOT for Distribution

1

2
3
4
5
6
7
8 **EFFECT OF PERITONEAL CAVITY LAVAGE WITH 0.9% AND 3% SALINE**
9 **SOLUTION IN THE LUNG AND SPLEEN OF GERBILS WITH INDUCED**
10 **PERITONITIS**

11
12
13 Vinicius Rodrigues Taranto Nunes¹, Rafael Calvão Barbuto², Paula Vieira
14 Teixeira Vidigal³, Guilherme Nogueira Pena⁴, Silvia Lunardi Rocha⁵, Lucas Tourinho de
15 Siqueira⁶, Marcelo Vidigal Callari⁷, Ivana Duval de Araujo⁸.

16
17
18
19 1- Fellow of Master Degree, Postgraduate Program in Surgical Sciences
20 program, Medical School, Universidade Federal de Minas Gerais.

21
22 2- MD, PhD. Professor of Surgery Department, Medical School, Universidade
23 Federal de Minas Gerais

24
25 3- MD, PhD. Professor of Medical Pathology Department, Medical School,
26 Universidade Federal de Minas Gerais

27
28 4- MD. Surgeon

29
30 5- Medical Student. Initiation in Research Program.

31
32 6- MD.

33
34 7- PhD. Professor of Department of General Pathology, Biological Sciences
35 Institute, Universidade Federal de Minas Gerais

36
37 8- MD, PhD. Professor of Surgery Department, Medical School, Universidade
38 Federal de Minas Gerais

39
40 **Institution:** Medical School, Universidade Federal de Minas Gerais – Av Prof Alfredo
41 Balena, 190. Belo Horizonte – MG – Brasil. CEP 30130-100.

42
43
44 **Key words:** peritonitis, peritoneal lavage, systemic inflammatory response syndrome,
45 acute respiratory distress syndrome, hypertonic saline solution, sepsis.
46
47

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Abstract

Background: Peritoneal cavity lavage is widely spread in the treatment of peritonitis. Nonetheless, some studies question its rationale and prove it to be deleterious to the mesothelium. The present study aims to determine whether 0.9% and 3% saline lavage of the peritoneal cavity has an effect on the early systemic inflammatory response, namely, in the lung injury and splenic cellularity of gerbils with induced peritonitis.

Methods: Thirty four male gerbils were divided into four groups: *Control* ($n=9$), submitted to laparotomy at time zero, re-laparotomy after 2 h, and sacrifice after a total of 6 hours from start; *Untreated* ($n=8$), submitted to peritonitis induction through cecal ligation and puncture (CLP) at time zero, re-laparotomy intended for drying of abdominal cavity and resection of the ischemic cecum after 2 h, and sacrifice after a total of 6 h from start; *Saline* ($n=8$), submitted to peritonitis induction through CLP at time zero, re-laparotomy intended for warm 0.9% saline lavage of the abdominal cavity and resection of the ischemic cecum after 2 h, and sacrifice after a total of 6 h from start; and *Hypertonic* ($n=9$), submitted to peritonitis induction through CLP at time zero, re-laparotomy intended for warm hypertonic saline (3%) lavage of the abdominal cavity and resection of the ischemic cecum after 2 h, and sacrifice after a total of 6 h from start. After sacrifice, we collected the left lung and the spleen for morphometric analysis.

Results: In the saline and hypertonic group there was a significant decrease in the mean nuclei count in the lungs, when compared to the untreated group ($p<0.01$). There was no difference in terms of nuclei count in the spleen among groups ($p>0.05$).

Conclusions: The present study demonstrated that the peritoneal lavage with large volumes of warm 0.9% and 3% saline has a beneficial effect on the early systemic inflammatory response in septic animals, modulating and reducing the lung injury, but no effect on splenic cell count.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Introduction

Peritoneum reacts to noxious stimuli in a relatively uniform manner, creating a local and systemic inflammatory reaction. When peritonitis occurs, fast bacterial proliferation impairs the peritoneal inflammatory response, leading to bacterial translocation and sepsis[1].

Despite advances in prevention, diagnosis, treatment, and care in recent years, the mortality rates have remained unchanged[2].

Lavage of the peritoneal cavity is a treatment method widely used by surgeons, aimed at removing the particles that are potential sources of contamination, which could cause persistence or exacerbation of the peritoneal inflammatory response[3].

Although commonly used, lavage of the peritoneal cavity has no consensus among surgeons. Many variables of the technique are still empirical (such as the methods of performing the lavage, type of fluid and volume used, among the others), and evidence is still scarce on the subject, being dependent on the experience of each surgeon.

A questionnaire conducted in England revealed that 97% of the surgeons are adherent to the practice of washing the peritoneal cavity. It also showed that most of the surgeons perform the lavage until the aspirated fluid is clear, with no signs of contaminants, which usually occurs with 500–1000 ml[4].

There are many lines of research on this subject with conflicting results. Some studies propose that the lavage interferes with defense mechanisms, promoting the spread of pathogens in the abdominal cavity, with little or no interference in the prognosis of patients[5]. Others suggest that it modulates the inflammatory response and reduces end-organ damage, improving the survival[6].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The intravenous (IV) use of hypertonic saline has been proven beneficial as a part of the treatment of multiple organ dysfunction syndrome due to peritonitis[7]. Shih *et al.*[7] demonstrated that animals treated with IV hypertonic saline had reduced levels of nitric oxide and interleukin 1 β in plasma and oxygen free radicals in organs, and it also prevented circulatory collapse, reduced mortality, and organ dysfunction.

The present study aims to determine whether hypertonic saline lavage of the peritoneal cavity has an effect on early systemic inflammatory response, namely, in the lung injury and splenic cellularity of gerbils with induced peritonitis.

Materials and Methods

This work was approved by the Ethics Committee of Animal Research (CETEA) of the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), according to protocol 186/2011.

Subjects and Experimental Groups

Thirty-four male gerbils, 12 weeks old and weighing 75–90 g, were used in the experiments. The animals were obtained from the Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB – UFMG) and were maintained in collective cages, and provided rodent chow (Labina $\text{\textcircled{R}}$, Purina) and water *ad libitum* prior to the experiments.

The animals were divided into four following experimental groups:

Control ($n=9$), subjected to laparotomy at time zero, re-laparotomy after 2 h, and sacrifice after a total of 6 hours from start.

Untreated ($n=8$), subjected to peritonitis induction through cecal ligation and puncture (CLP) at time zero, re-laparotomy intended for drying of abdominal cavity and resection of the ischemic cecum after 2 h, and sacrifice after a total of 6 h from start.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

5

Saline ($n=8$), subjected to peritonitis induction through CLP at time zero, re-laparotomy intended for warm 0.9% saline lavage of the abdominal cavity and resection of the ischemic cecum after 2 h, and sacrifice after a total of 6 h from start.

Hypertonic ($n=9$), subjected to peritonitis induction through CLP at time zero, re-laparotomy intended for warm hypertonic saline (3%) lavage of the abdominal cavity and resection of the ischemic cecum after 2 h, and sacrifice after a total of 6 h from start.

Induction of Peritonitis

Gerbils were anesthetized with intraperitoneal injection of a solution of xylazine (8 mg/Kg) and ketamine (60 mg/Kg). The abdominal wall was disinfected with 0.05% chlorhexidine, and a 2-cm midline laparotomy was performed. Peritonitis was induced by CLP, which consisted of the ligation of the antimesenteric surface of the cecum with a 5.0 silk and puncture of the cecal sac with scissors (2mm extension). The abdominal wall was closed using a 4.0 nylon total continuous suture. In the control group, a laparotomy was performed and only the viscera were manipulated, followed by closure of the abdominal wall. Animals had access to water *ad libitum* right after the procedure.

Peritoneal Lavage

After a 2-h observation period, the animals were submitted to re-laparotomy under anesthesia, the ischemic cecal sac was excised, and the peritoneal cavity was treated according to each group. In the untreated group, the cavity was dried with sterile gauze and closed. In the saline group, the lavage was performed with 10 ml of warm (38°C) 0.9% sodium chloride solution for three times (five minutes for each of the three lavages), followed by drying of the cavity and closure of the abdominal wall. In the hypertonic group, the lavage was carried out with 10 ml of warm (38°C) 3% sodium chloride solution for three times (five minutes for each of the three lavages), followed

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

6

by drying of the cavity and closure of the abdominal wall. In the control group, the animals were submitted to re-laparotomy, with viscera manipulation and closure of the abdominal wall. All animals received one dose of intramuscular ceftriaxone (30 mg/Kg) after this second surgery.

Necropsy

At the end of a total of 6-h observation period, the animals were submitted to euthanasia by anesthetic overdose (intraperitoneal 200 mg/Kg ketamine + 25 mg/Kg xylazine), the spleen was obtained through laparotomy, and the left lung was obtained through sternotomy, and both were fixed in 10% buffered formalin.

Morphometric analysis

The spleen and left lung were embedded in paraffin and sections of 4 μm were prepared in slides and stained with hematoxylin and eosin. The morphometric analysis of the pulmonary inflammatory infiltrate was conducted to produce 10 randomly captured images on each plane (upper, middle, and lower) of the left lung, which was visualized using a 40 \times objective and digitized using a microcamera (JVC TK-1270/RGB), measuring a total of approximately $1.6 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ of the analyzed tissue. On the other hand, the morphometric analysis of splenic cellularity was determined by producing 30 randomly captured images of the red pulp, following the same mechanism described for the lung.

All cells in each image were quantified using the KS300 software program from the Carl Zeiss Image Analyzer. The nucleus of leukocytes and other cell types usually present in lung and splenic tissue were counted through nuclear pixel selection from the real image, and subsequently transformed into a binary image for later analysis. For the final analysis, the images captured on the different planes were grouped to determine the cellular count in each animal's lung. The pathological changes were

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

7

assessed by a pathologist blinded to the animal groups. The results of total nuclei count were expressed as number of cells $\times 10^2$.

Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm Standard Deviation. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test, with $p < 0.05$ accepted as statistically significant.

Results

Lung

In the control group, the mean nuclei count in 30 random fields was 8.3 ± 1.6 . In the untreated group, the mean nuclei count was 11.7 ± 1.7 , with a significant difference, when compared with the control group ($p < 0.001$).

The saline group had a mean 9.2 ± 1.6 nuclei count, with a significant difference, when compared with the untreated group ($p < 0.005$), and no significant difference, when compared with the control group ($p > 0.05$).

The hypertonic group had a mean 9.2 ± 1.3 nuclei count, with a significant difference, when compared with the untreated group ($p < 0.003$), and no significant difference, when compared with the control group ($p > 0.05$; Fig. 1).

The hypertonic group, when compared with the saline group, had no significant difference in terms of nuclei count ($p > 0.05$; Fig.2).

Spleen

In the control group, the mean nuclei count in 30 random fields was 18 ± 3.7 . In the untreated group, the mean nuclei count was 16.6 ± 3.7 , with no significant difference, when compared with the control group ($p > 0.05$).

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

8

The saline group had a mean 17.2 ± 5.1 nuclei count, with no significant difference, when compared with the untreated group ($p>0.05$) and control group ($p>0.05$).

The hypertonic group had a mean 14.9 ± 3.7 nuclei count, with no significant difference, when compared with the untreated group ($p>0.05$) and control group ($p>0.05$; Fig 3).

Discussion

Secondary bacterial peritonitis and its complications, such as septic shock and multiple organ dysfunction syndrome, are still important causes of death in surgical practice[8]. Its pathophysiology not only involves local injury, but also end-organ injury (such as the lung), which are associated with greater mortality in abdominal sepsis. The lungs have been considered as the remote organ most commonly affected (74% of the cases[9]), and is usually the first organ to fail and one of the main causes of death in patients with peritonitis[10]. Inflammatory conditions can cause increased oxidative activity of the lung, resulting in peroxidation of the membrane and secretion of cytokines by activated macrophages, causing a persistent inflow of neutrophils to the lung[11,12].

It has also been proven that pulmonary neutrophil count increases and reaches a plateau at 5 h after inducing peritonitis[10]. Therefore, although such an early intervention during abdominal sepsis is rarely seen in clinical practice, our observational period suffices to evaluate the early pulmonary inflammatory response.

The precise immunologic role of the spleen in sepsis is still debated. It has already been established that splenectomized patients are at higher risk of developing lethal septic shock[13]. Nonetheless, some recent studies have concluded that splenectomy does not worsen survival during polymicrobial abdominal sepsis, but

9

actually reduces liver damage and decreases lethality[13,14]. The mechanism involved in this protection involves the reduction of systemic HMGB1 (high mobility group box 1) and maintenance of Th1-dependant serum cytokine response, reducing sepsis-induced liver injury[14]. Santos *et al.*[15] demonstrated that splenic exudation occurs 48 h after peritonitis induction, due to which we could not detect any change in splenic cellularity in the present study.

Over the past decades, the adjunctive use of peritoneal lavage by surgeons has been widely debated, and clinical studies have not come to a consensus. The first surgical approach to peritonitis was proposed by the surgeon Mikulicz in 1889[16]. His concept was that an early operation, with elimination of the focus and lavage of the cavity, could interrupt the vicious circle of inflammation and improve survival of the patients. Such concepts are still the basis of the treatment, and Seiler *et al.* demonstrated that among 258 patients diagnosed with diffuse peritonitis, 88% were successfully treated according to Mikulicz's concepts[17].

It is already clear that washing the peritoneal cavity also has its adverse aspects in the peritoneal defense mechanisms. Haagen *et al.*[18] and Edmiston *et al.*[19] found that bacteria adhere to the mesothelial cells and the lavage results in only transient reductions in the bacterial populations. Moreover, lavage can remove important inflammatory mediators (i.e., complement proteins, proteases, opsonic proteins, and immunoglobulins), impairing peritoneal defense mechanisms[20]. Washing the cavity can also retard the healing process of the compromised mesothelial cells and cause even more injury to the mesothelial cell membranes[3,21].

Nonetheless, most studies have proved that the lavage of the peritoneal cavity can reduce bacterial load, inhibit bacterial proliferation, and is better than no treatment[2,20,22]. Our study confirmed that washing the peritoneal cavity with 0.9%

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

10

or 3% saline solutions is better than systemic antibiotics alone in the treatment of peritonitis.

So far, there is neither a consensus on the best technique of peritoneal lavage, nor on the best solution to be employed. A recent meta-analysis favored the use of antibiotic in the lavage solution[2]. Other studies found no appreciable advantage in using them as long as systemic antibiotics are being used[23]. Solutions with antiseptics (such as povidone-iodine or chlorhexidine) and altered pH demonstrated controversial effects among different studies[1,3]. Local anesthetics (i.e. lidocaine) seem to improve the survival when used in the lavage solution[24]. It has already been suggested that large volumes of solution are more efficacious[25], a principle that was assured in this study.

The use of IV 7,5% hypertonic saline has already been studied in the treatment of systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and adult respiratory distress syndrome (ARDS) due to various causes (pancreatitis, ischemia-reperfusion, hemorrhagic shock, fat embolism, peritonitis)[7,26,27,28,29]. Its use is safe and apparently helps to modulate the systemic inflammatory response by restoring the circulating volume and exerting favorable effect on cardiac contractility, blood pressure, and peripheral tissue perfusion[26]. In our experiment, we hypothesized if local treatment with a hypertonic (3%) saline could have an immunomodulatory effect in the peritoneum, therefore decreasing the systemic inflammatory response and end-organ damage caused by peritonitis. We were not able to prove any additional benefits from the intraperitoneal use of 3% saline in contrast to the 0,9% saline, which probably indicates that the local effect of the hypertonic solution is merely of mechanical removal of contaminants and endotoxin clearance. We opted for a 3% concentration instead of 7,5% described in the literature because the latter is used systemically and we used the former locally. Considering the fact that the solution was used exclusively in the

11

abdominal cavity and that the greater omentum presents a high permeability, the use of a high osmolarity solution would be responsible for a great amount of liquid extravasation into the peritoneal cavity, enhancing the hypovolemia, fact that explains the early death of all the animals in which a 7,5% solution was used in the pilot experiment.

This study has some limitations. Animals did not receive intravenous fluid for resuscitation of abdominal sepsis, and we did not obtain data regarding whether the animals were in septic shock or a hypoperfused state, i.e. no lactate or base deficit was obtained. Nonetheless, it is important to notice that we aimed to analyze the early effects of peritonitis, therefore, we did not expect relevant hemodynamic and metabolic disturbances in these animals, reason why we opted not to resuscitate in order to annul the effects of volemic resuscitation. It has already been proven that fluid is not absorbed from the abdominal cavity of an inflamed peritoneum[30]. Hence, in the experimental groups that had their cavity washed there was no fluid resuscitation consequent from the lavage itself. The lungs and spleen were examined, but other organs (i.e. liver and the kidneys) which are also prone to end organ damage in sepsis and septic shock states were not examined in this study. Also, no data regarding peritoneal bacteriology were obtained. These data would provide important information regarding the local effect of the perioperative peritoneal lavage strategies. Also important to notice is that in clinical practice, it is very rare to treat patients in such an early phase of sepsis. The short duration of the study is a significant study limitation and additional studies will be required to investigate the late inflammatory response in this experimental abdominal sepsis model.

Formatted: Highlight

Conclusions

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

12

The present study demonstrated that the peritoneal lavage with large volumes of warm 0.9% saline has a beneficial effect on the early systemic inflammatory response in septic animals, modulating and reducing the lung injury, which is in accordance with the medical literature[6]. Moreover, it revealed that washing the cavity with large volumes of warm hypertonic (3%) saline is also beneficial and reduces early pulmonary inflammatory response. Both saline and hypertonic groups presented no difference in terms of lung leukocyte infiltration, when compared with the control group, indicating that lavage was not only able to withhold the inflammatory response, but also reverse the process. We could not prove any difference between the 3% and 0.9% saline groups.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

Reprints Request and Correspondence

Vinicius Rodrigues Taranto Nunes

Surgery Department, Medical School, Universidade Federal de Minas Gerais –
Av Prof Alfredo Balena, 190 / 203. Belo Horizonte – MG – Brasil. CEP 30130-100.

vivas1912@hotmail.com

References

13

1- Araujo ID, Grossi GCX, Diniz SOF, et al. Effects of the povidone-iodine (PVPI) in treatment of bacterial peritonitis induced in rats. *Acta Cir Bras* 2010; 25(4):322-327.

2- Qadan M, Dajani D, Dickinson A, et al. Meta-analysis of the effect of peritoneal lavage on survival in experimental peritonitis. *BR J Surg* 2010; 97:151-159.

3- Platell C, Papadimitriou JM, Hall JC. The influence of lavage on peritonitis. *J Am Coll Surg* 2000; 191(6):672-680.

4 - Whiteside OJH, Tytherleigh MG, Thrush S, et al. Intra-operative peritoneal Lavage – Who does it and Why? *Ann R Coll Surg Engl* 2005;87:255-258.

5- Haagen IA, Heezius HC, Verkooyen RP, et al. Adherence of peritonitis-causing staphylococci to human peritoneal mesothelial cell monolayers. *J Infect Dis* 1990; 161: 266–273.

6- van Till JWO, Lamme B, van Esch TJH, et al. Surgical Therapy Attenuates Abdominal and Extra-Abdominal Inflammation in Experimental Peritonitis. *Eur Surg Res* 2006; 38(2): 76-82.

7- Shih CC, Chen SJ, Chen A, et al. Therapeutic effects of hypertonic saline on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *Crit Care Med* 2008; 36(6): 1864-1872.

8- Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980;29:189-201.

9 - Vincent JL, Puri VK, Carlson RW, et al. Acute respiratory failure in patients with generalized peritonitis. *Resuscitation* 1983;10 (4):283-90.

10 – Fukatsu K, Saito H, Han I, et al. Concomitant Increase in Neutrophil Adhesion to Inflammatory Peritoneum and Remote Organs during Peritonitis. *J Surg Res* 1999;81:156-163.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

14

11 - Mercer-Jones MA, Heinzelmann M, Peyton JC, *et al.* The pulmonary inflammatory response to experimental fecal peritonitis: relative roles of tumor necrosis factor-alpha and endotoxin. *Inflammation* 1997;21(4):401-17.

12- Anderson B, Brown J, Harken A. Mechanisms of Neutrophil-Mediated Tissue Injury. *J Surg Res* 1991;51:170.

13 - Kono H, Fujii H, Ogiku M, *et al.* The Kupffer Cell Inhibition Exacerbates but Splenectomy Prevents Mortality in a Rat Septic Peritonitis Model. *J Surg Res* 2012;175:101-112.

14- Huston JM, Wang H, Ochani M, *et al.* Splenectomy Protects against Sepsis Lethality and Reduces Serum HMGB1 Levels. *J Immunol* 2008;181:3535-3539.

15 - Santos VV, Fröde TS, Medeiros YS. Analysis of the Temporal Events in Blood and Tissues Following Fecal Peritonitis in Mice. *In vivo* 2004;18:571-576.

16- Mikulicz J. Weitere Erfahrungen über die operative Behandlung der Perforationsperitonitis. *Arch Klin Chir (Berl)* 1889; 39:756-784.

17- Seiler CA, Brügger L, Forssmann U, *et al.* Conservative surgical treatment of diffuse peritonitis. *Surgery* 2000;127(2):178-184.

18 - Haagen IA, Heezius HC, Verkooyen RP, *et al.* Adherence of peritonitis-causing staphylococci to human peritoneal mesothelial cell monolayers. *J Infect Dis* 1990;161:266-273.

19 - Edmiston CE Jr, Goheen MP, Kornhall S, *et al.* Fecal peritonitis: microbial adherence to serosal mesothelium and resistance to peritoneal lavage. *World J Surg* 1990;14:176-183.

20- Maddaus MA, Ahrenholz D, Simmons RL. The Biology of Peritonitis and Implications for Treatment. *Surg Clin North Am* 1998;68: 431-443.

21 - Breborowicz A, Rodela H, Oreopoulos DG. Toxicity of osmotic solutes on human mesothelial cells in vitro. *Kidney Int* 1992;41:1280-1285.

15

22- Kleine HO, Berger HG. Endotoxin in the peritoneal fluid of bacterial peritonitis. *Chir Forum* 1988;301-304.

23- Batalik B, Mydlo J. Peroperative peritoneal lavage and intraabdominal instillation of antibiotics in an experiment. *Rozhl Chir* 1991;70:300-303.

24- Brocco MC, Paulo DNS, Baptista JFA, et al. Effects of Peritoneal Lavage with Lidocaine on Survival of Rats with Fecal Peritonitis. *Acta Cir Bras* 2008; 23(1):42-47.

25 - Sugimoto K, Hirata M, Kikuno T, et al. Large-volume intraoperative peritoneal lavage with an assistant device for treatment of peritonitis caused by blunt traumatic rupture of the small bowel. *J Trauma* 1995;39:689-692.

26 – Shields CJ, Winter DC, Sookhal S, et al. Hypertonic saline attenuates end-organ damage in an experimental model of acute pancreatitis. *Br J Surg* 2000; 87: 1336-1340.

27- Shields CJ, Winter DC, Manning BJ, et al. Hypertonic Saline Infusion for Pulmonary Injury due to Ischemia-Reperfusion. *Arch Surg* 2003; 138: 9-14.

28- Staudenmayer KL, Maier RV, Jelacic S, et al. Hypertonic Saline Modulates Innate Immunity in a Model of Systemic Inflammation. *Shock* 2005;23:459-463.

29- Kennedy MT, Higgins BD, Costello JF, et al. Hypertonic Saline Reduces Inflammation and Enhances the Resolution of Oleic Acid Induced Acute Lung Injury. *BMC Pulm Med* 2008; 8: 9.

30- Scheingraber S, Boehme J, Scharbert G, et al. Monitoring of acid-base and regulating variables during abdominal lavage. *Anaesth Intensive Care* 2004;32:637-643.

Figure Legends:

Fig. 1 – Lung nuclei count expressed as mean \pm Standard Deviation.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

16

Fig.2 – Digitalized image of the left lung (40× objective lens). A – Control group displaying normal architecture; B – Untreated group (massive destruction of parenchyma with alveolar collapse, edema, thickening of the alveolar wall, polymorphonuclear cellular infiltration, and hemorrhagic exudate); C – Saline group; D – Hypertonic group. Both C and D present congestion and moderate inflammatory infiltration.

Fig. 3 – Spleen nuclei count expressed as mean ± Standard Deviation.

18/05/13

Mensagem de Impressão do Outlook

Surgical Infections - Decision on Manuscript ID SUR-2013-019.R2

De: **onbehalfof+leinan+umich.edu@manuscriptcentral.com** em nome de **leinan@umich.edu**

Enviada: domingo, 21 de abril de 2013 14:50:43

Para: **vivas1912@hotmail.com**

Cc: **leinan@med.umich.edu; blademd@aol.com; pbarie@med.cornell.edu**

21-Apr-2013

Dear Mr. Nunes:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "EFFECT OF PERITONEAL CAVITY LAVAGE WITH 0.9% AND 3% SALINE SOLUTION IN THE LUNG AND SPLEEN OF GERBILS WITH INDUCED PERITONITIS" in its current form for publication in Surgical Infections.

Please be sure to cite this article to ensure maximum exposure of your work.

All authors will receive a follow-up email with instructions on how to complete our online Copyright Agreement.

FAILURE BY ALL AUTHORS TO SUBMIT THIS FORM MAY RESULT IN A DELAY OF PUBLICATION.

The corresponding author is responsible for communicating with coauthors to make sure they have completed the online copyright form. Authors not permitted to release copyright must still return the form acknowledging the statement of the reason for not releasing the copyright. The corresponding author will receive notification when all copyright forms have been submitted.

Consider Liebert Open Option to have your paper made free online immediately upon publication for a one-time fee. Benefits of Liebert Open Option include: accelerated e-pub ahead of print publication; email message highlighting the article; increased readers, citations and downloads; an identifying icon in the table of contents showing that the paper is permanently available for free to all readers; and immediate deposition into PubMed Central®. Subsequent accepted papers are eligible for a reduced fee for Open Option. Please contact Karen Ballen at kballen@liebertpub.com or at (914) 740-2194 for more information.

If your institution is not currently subscribing to this journal, please ensure that your colleagues have access to your work by recommending this title (http://www.liebertpub.com/mcontent/files/lib_rec_form.pdf) to your Librarian.

18/05/13

Mensagem de Impressão do Outlook

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Surgical Infections, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,
Dr. Lena Napolitano
Editor-in-Chief, Surgical Infections
lenan@umich.edu

APÊNDICE B - TABELAS DE MORFOMETRIA PULMONAR

Tabela 1 – Contagem nuclear em 30 campos aleatórios no pulmão esquerdo de animais do grupo controle

Campo	Controle 1	Controle 2	Controle 3	Controle 4	Controle 5	Controle 6	Controle 7	Controle 8	Controle 9
1	204	247	290	155	151	124	230	185	208
2	142	240	351	183	202	144	271	211	224
3	193	260	324	237	260	208	240	166	328
4	246	255	389	252	224	212	264	160	250
5	278	288	390	227	346	207	296	191	347
6	197	319	292	171	359	128	358	187	340
7	390	338	377	176	323	224	342	210	314
8	236	373	357	155	306	298	216	186	339
9	272	337	338	181	410	315	248	189	201
10	446	386	390	162	280	311	250	277	187
11	332	363	278	242	230	408	243	192	129
12	415	355	251	144	297	339	292	214	159
13	341	351	358	269	347	339	316	185	258
14	431	265	224	194	251	354	298	168	286
15	351	419	301	116	461	377	315	191	213
16	337	340	287	132	494	412	383	191	227
17	284	284	266	170	403	346	362	219	294
18	346	293	326	159	288	379	270	217	138
19	338	286	344	177	294	421	295	290	140
20	317	245	247	185	407	323	372	182	182
21	296	351	236	231	265	300	318	234	222
22	318	374	297	201	333	274	265	212	285
23	284	414	296	273	177	154	261	262	233
24	364	225	359	166	375	238	243	263	267
25	373	255	401	110	308	344	420	243	270
26	288	289	315	176	362	457	361	246	276
27	349	300	304	147	308	361	260	163	317
28	344	354	304	124	388	276	294	190	256
29	316	405	382	149	368	221	325	179	197
30	386	367	355	200	328	225	293	166	370

Tabela 2 – Contagem nuclear em 30 campos aleatórios no pulmão esquerdo de animais do grupo sem lavagem

Campo	Sem Lavagem 1	Sem Lavagem 2	Sem Lavagem 3	Sem Lavagem 4	Sem Lavagem 5	Sem Lavagem 6	Sem Lavagem 7	Sem Lavagem 8
1	379	337	417	413	459	369	418	336
2	351	378	404	489	427	388	368	460
3	482	404	389	387	524	414	451	401
4	279	399	406	276	559	401	404	352
5	312	312	401	488	464	410	352	334
6	422	381	402	417	474	421	484	368
7	364	399	405	463	524	395	379	383
8	408	376	457	405	457	377	344	395
9	299	344	429	430	450	388	357	370
10	358	351	487	448	446	349	362	324
11	348	419	441	476	487	375	292	272
12	361	372	375	464	512	389	340	337
13	364	318	405	400	458	344	314	376
14	413	378	527	435	495	403	432	281
15	418	408	419	441	523	378	363	360
16	326	413	380	361	467	334	270	312
17	403	375	391	461	535	379	347	152
18	306	316	380	442	599	404	332	264
19	330	349	411	453	509	373	372	290
20	413	349	368	465	578	289	349	246
21	362	357	401	437	474	327	354	241
22	408	321	450	430	430	373	376	301
23	328	335	351	479	517	335	408	299
24	344	428	316	434	493	342	309	264
25	409	366	471	479	424	330	309	128
26	305	347	386	425	511	366	415	161
27	328	350	407	691	501	307	384	321
28	393	317	389	446	468	324	403	383
29	402	314	480	412	429	340	277	300
30	334	345	486	434	508	334	347	301

Tabela 3 – Contagem nuclear em 30 campos aleatórios no pulmão esquerdo de animais do grupo salina

Campo	Salina 1	Salina 2	Salina 3	Salina 4	Salina 5	Salina 6	Salina 7	Salina 8
1	228	342	313	251	149	442	285	292
2	289	311	202	345	185	425	277	329
3	344	319	318	288	214	496	335	385
4	413	257	216	237	274	399	398	360
5	266	310	122	208	271	478	372	452
6	340	284	115	327	435	375	182	423
7	329	261	117	249	289	476	177	381
8	326	224	148	222	355	548	180	350
9	238	199	156	433	335	380	263	312
10	209	211	212	346	247	486	303	335
11	260	230	236	389	269	377	370	410
12	171	263	149	410	291	403	281	333
13	245	313	159	362	263	321	240	338
14	189	308	248	396	206	360	251	380
15	249	304	249	470	330	457	244	297
16	325	316	357	431	302	429	280	361
17	355	304	365	431	308	477	325	362
18	231	287	401	445	340	406	316	261
19	274	365	243	259	218	405	318	327
20	295	291	294	262	335	295	290	352
21	259	311	316	257	325	453	350	305
22	230	353	182	239	294	553	282	412
23	322	282	173	325	263	452	300	305
24	253	305	211	355	248	407	300	267
25	252	330	269	261	296	449	350	319
26	225	252	206	218	244	391	278	283
27	300	297	316	235	271	480	143	313
28	288	231	206	269	412	248	188	247
29	238	286	297	150	373	253	251	186
30	209	291	270	301	475	386	243	257

Tabela 4 – Contagem nuclear em 30 campos aleatórios no pulmão esquerdo de animais do grupo hipertônico

	Hipertônico	Hipertônico	Hipertônico	Hipertônico	Hipertônico	Hipertônico	Hipertônico	Hipertônico	Hipertônico
Campo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	262	269	319	242	148	155	351	163	179
2	246	226	270	205	255	251	408	271	127
3	295	216	227	436	220	279	328	289	158
4	285	303	206	374	352	303	383	361	132
5	202	287	247	278	301	216	458	475	94
6	230	261	252	320	111	282	349	399	116
7	200	319	189	260	84	259	368	406	121
8	233	320	258	365	245	301	384	360	47
9	233	387	251	332	226	437	318	392	53
10	331	438	244	281	157	331	331	308	37
11	242	359	310	233	204	271	292	208	33
12	199	448	327	112	248	312	403	297	56
13	287	420	283	272	306	361	288	355	30
14	247	398	220	216	334	301	296	409	38
15	263	448	257	354	275	264	383	325	121
16	369	398	267	305	264	192	379	292	91
17	353	448	208	297	354	279	371	423	143
18	343	396	389	296	269	322	389	316	113
19	375	387	293	394	257	255	336	354	42
20	356	329	276	413	150	205	411	253	101
21	339	385	234	270	205	264	332	307	61
22	320	450	280	235	348	231	390	285	107
23	375	438	278	382	306	418	383	279	96
24	312	409	240	409	284	372	434	264	17
25	336	417	380	352	296	370	367	341	22
26	286	397	250	331	111	319	392	384	63
27	271	382	208	385	264	303	283	276	27
28	240	416	234	185	172	269	371	357	71
29	316	432	306	317	279	367	403	294	10
30	269	408	213	165	302	336	150	310	33

ANEXO A - CERTIFICADO DO CETEA



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 186/2011**, relativo ao projeto intitulado "***Efeito da lavagem da cavidade peritoneal com solução salina a 3% na resposta inflamatória sistêmica de Gerbis com peritonite induzida***", que tem como responsável(is) **Ivana Duval de Araujo**, 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 **24/ 08/2011**.

Este certificado expira-se em **24/ 08/ 2016**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 186/2011**, related to the project entitled "***Effect of washing the peritoneal cavity with 3% saline in the systemic inflammatory response of Gerbils with induced peritonitis***", under the supervisors of **Ivana Duval de Araujo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 24, 2011**.


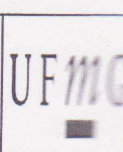
This certificate expires in **August 24, 2016**.

Belo Horizonte, 30 de Agosto de 2011.

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 B – ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO

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

**ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DO ALUNO
VINICIUS RODRIGUES TARANTO NUNES- 2012655550**


Realizou-se, no dia 12 de agosto de 2013, às 14:00 horas, Centro de Pós Graduação da Faculdade de Medicina da UFMG, sala 526 5º andar, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada **“EFEITO DA LAVAGEM DA CAVIDADE PERITONEAL COM SOLUÇÕES SALINAS A 0,9% E A 3% NA INJÚRIA PULMONAR PRECOCE DE GERBIS COM PERITONITE INDUZIDA”**, apresentada por VINICIUS RODRIGUES TARANTO NUNES, graduado no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof^a. Ivana Duval de Araujo - Orientador (UFMG), Prof. Rafael Calvão Barbuto - Coorientador (UFMG), Prof. Cleber Dario Pinto Kruehl (UFRGS), Prof. Antonio Lacerda Filho (UFMG).


A Comissão considerou a dissertação:


Aprovada

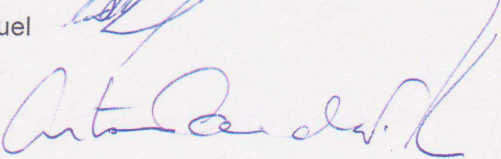
Reprovada

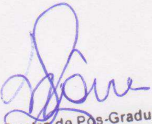
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 12 de agosto de 2013.

Prof^a. Ivana Duval de Araujo 
Doutora - UFMG

Prof. Rafael Calvão Barbuto 
Doutor - UFMG

Prof. Cleber Dario Pinto Kruehl 
Doutor - UFRGS

Prof. Antonio Lacerda Filho 
Doutor - UFMG


Centro de Pós-Graduação
Faculdade de Medicina / UFMG
Av. Prof. Alfredo Balena, 190 - 5º andar
CEP: 30130-100 - Funcionários - BH/MG

ANEXO C – FOLHA DE APROVAÇÃO



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

UFMG


FOLHA DE APROVAÇÃO

EFEITO DA LAVAGEM DA CAVIDADE PERITONEAL COM SOLUÇÕES SALINAS
A 0,9% E A 3% NA INJÚRIA PULMONAR PRECOCE DE GERBIS COM
PERITONITE INDUZIDA

VINICIUS RODRIGUES TARANTO NUNES

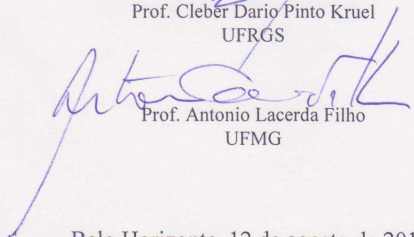
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, área de concentração RESPOSTA INFLAMATÓRIA À AGRESSÃO

Aprovada em 12 de agosto de 2013, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Ivana Duval de Araujo - Orientador
UFMG


Prof. Rafael Calvão Barbutto - Coorientador
UFMG


Prof. Clebér Dario Pinto Kruel
UFRGS


Prof. Antonio Lacerda Filho
UFMG

Belo Horizonte, 12 de agosto de 2013.