

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

YURI LOBATO GUIMARÃES

ARGININA COMO IMUNOMODULADOR DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA
PULMONAR EM CAMUNDONGOS COM PERITONITE INDUZIDA

Belo Horizonte

Minas Gerais - Brasil

2017

YURI LOBATO GUIMARÃES

ARGININA COMO IMUNOMODULADOR DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA
PULMONAR EM CAMUNDONGOS 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

2017

Guimarães, Yuri Lobato.

G963a Arginina como imunomodulador da resposta inflamatória pulmonar em camundongos com peritonite induzida [manuscrito]. / Yuri Lobato Guimarães. -- Belo Horizonte: 2017.
60f.: il.

Orientador (a): Ivana Duval de Araújo. Coorientador

(a): Rafael Calvão Barbuto.

Área de concentração: Resposta inflamatória à Agressão Tecidual.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Peritonite. 2. Lavagem Peritoneal. 3. Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica. 4. Síndrome do Desconforto Respiratório do Adulto. 5. Arginina. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Araújo, Ivana Duval de. II. Barbuto, Rafael Calvão. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM : WI 575

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



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

UFMG
■ ■ ■


FOLHA DE APROVAÇÃO

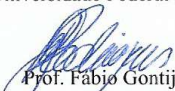
ARGININA COMO IMUNOMODULADOR DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA
PULMONAR EM CAMUNDONGOS COM PERITONITE INDUZIDA

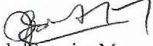
YURI LOBATO GUIMARÃES

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.

Aprovada em 27 de novembro de 2017, pela banca constituída pelos membros:


Prof. Ivana Duval de Araújo - Orientadora
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof. Fábio Gontijo Rodrigues
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof. José Eduardo Ferreira Manso
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Belo Horizonte, 27 de novembro de 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR: Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

VICE-REITORA: Prof. Dra. Sandra Goulart Almeida

PRÓ-REITORA DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dra. Denise Maria Trombert de Oliveira

PRÓ-REITOR DE PESQUISA: Prof. Dr. Ado Jorio de Vasconcelos

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

VICE-DIRETOR: Prof. Dr. Humberto José Alves

COORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dr. Luiz Armando Cunha de Marco

SUBCOORDENADOR DO CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO: Prof. Dr. Selmo Geber

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA: Prof. Dr. Renato Santiago Gomez

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE OFTALMOLOGIA E OTORRINOLARINGOLOGIA: Prof^a. Dr^a.

Ana Rosa Pimentel de Figueiredo

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À

CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA: Prof. Dr. Túlio Pinho Navarro

SUB-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À

CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA: Prof^a. Dr^a. Vivian Resende

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

Prof. Dr. Túlio Pinho Navarro (Coordenador)

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

Prof. Dr. Marco Antônio Percope

Prof. Dr. Marcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Marco Aurélio Lana Peixoto

Representante Discente: Taíse Miriam Cruz Mosso Ramos

A Idelvando, Cristina e João Lucas,
pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Começo meus agradecimentos lembrando a fala do saudoso Raul Seixas que diz: “sonho que se sonha só é só um sonho que se sonha só, mas sonho que se sonha junto é realidade”. Nada teria sido possível na realização deste trabalho se não fosse a ajuda de cada um que se empenhou, de sua forma, para que ele se concretizasse. A todos eles, meus sinceros agradecimentos.

À Faculdade de Medicina da UFMG e todos seus professores que foram minha escola desde a graduação de medicina e me transformaram no profissional médico de hoje.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Ivana Duval de Araujo, que me permitiu iniciar meus trabalhos na pesquisa científica, me incentivou ao mestrado e me ensinou muito do que sabe com carinho e dedicação. Meu grande exemplo de pesquisadora que resume, em sua personalidade, o entusiasmo e o espírito desafiador da pesquisa científica.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Rafael Calvão Barbuto, que foi um grande mestre desde a minha residência médica, que me ensinou os princípios básicos da cirurgia e experimentação animal, sempre muito atencioso e gentil, com conhecimentos valiosos e ensinamentos que levarei por toda minha carreira.

Ao Prof. Dr. Marcelo Vidigal Caliar, pelo tempo e paciência dedicados na morfometria pulmonar que foi essencial para análise dos nossos resultados.

Ao Prof. Frederico Melo, pelo auxílio, dedicação e atenção empenhados na realização da análise histológica que muito contribui com este trabalho.

Às acadêmicas de medicina; Liza Tavares Degani de Oliveira, Jamila Oliveira Dias e Paula Ramalho Lodi; pelos finais de semana dedicados a realização do experimento e por terem participado de todas as etapas desse trabalho de forma interessada e solícita.

Ao João Lucas Persilva Soares pelo incentivo incansável a cada dia dessa jornada do mestrado. Obrigado pela força, pelo companheirismo, pelo carinho e pela ajuda nos momentos difíceis. Sem você nada disso teria acontecido.

À minha mãe, Tereza Cristina Lobato Guimarães que sofreu junto comigo as angústias e rezou bastante para que tudo desse certo. Obrigado pelo amor e carinho de sempre.

Ao meu pai, Idelvando Guimarães Monteiro, meu exemplo de pessoa, pai e profissional, sempre extremamente ético e dedicado. Obrigado por todas as oportunidades que me proporcionou e por tudo que consegui conquistar mesmo com suas limitações em momentos difíceis. Serei eternamente grato pela maior herança que me deixou e que ninguém jamais me irá tomar: o conhecimento.

Aos meus amigos, em especial aos “mísers” e aos amigos de Carangola, por me fazerem acreditar que tudo iria dar certo e por confiarem na minha capacidade.

À Renata Persilva, ao Sérgio Arreguy, à Maria Clara Persilva e à Débora Persilva; minha segunda família de coração, pela torcida diária, pelas palavras de incentivo e pelo afeto e carinho de sempre.

Aos professores e preceptores da cirurgia geral do Hospital das Clínicas da UFMG e do Hospital Risoleta Tolentino Neves, em especial ao professor Mário Pastore, por todo ensinamento ético, técnico e científico que norteiam a minha profissão.

Ao amigo Diogo Souto Santana, colega da residência de cirurgia geral e de urologia, por todas as inúmeras vezes que precisei que me substituísse nas tarefas e por estar sempre disposto a me ajudar prontamente.

Aos preceptores e colegas da urologia do IPSEMG pelo apoio na conclusão dessa jornada e na conciliação das tarefas da residência e mestrado.

Ao residente Renan Teixeira, que muito ajudou no experimento, com seus conhecimentos e prática em experimentação animal.

Aos pacientes, motivação maior de todos os esforços na busca de compreender melhor a medicina e trazer alívio ao sofrimento diário com o qual nos solidarizamos durante todos os nossos dias de trabalho.

Aos animais, peças fundamentais para realização da experimentação. Minha solidariedade e agradecimento pelo sacrifício da vida em prol do conhecimento.

“A dúvida é o princípio da sabedoria.”

Aristóteles

RESUMO

INTRODUÇÃO: A sepse decorrente das infecções peritoneais secundárias é uma das principais causas de morte na clínica cirúrgica e em unidades de tratamento intensivo. Diversos fatores, como a imunocompetência do indivíduo e a virulência da cepa bacteriana têm sido causa importante no aumento da gravidade dessa afecção. Dentre suas complicações estão o acometimento de órgãos terminais, como pulmão, com a ocorrência de pneumonia e pulmão de choque. Em estudos experimentais, a administração de arginina prolongou a sobrevivência de animais com peritonite induzida, talvez por reduzir a inflamação e estimular o estado imunitário. **OBJETIVO:** Avaliar a resposta inflamatória pulmonar em camundongos com peritonite induzida e tratados com lavagem da cavidade peritoneal, complementada com administração de arginina por via sistêmica. **MÉTODO:** Foram utilizados 32 camundongos Balb/cAnNCrI distribuídos nos seguintes grupos experimentais: L-PL (n=8), laparotomia e administração de placebo; L-AR (n=8), laparotomia e administração da arginina; P-PL (n=8), indução da peritonite e administração de placebo; P-AR (n=8), indução da peritonite e administração de arginina. Os animais foram anestesiados e feita a indução da peritonite pela técnica de ligadura e secção do ceco. Em seguida, o abdome foi fechado, e após noventa minutos, feita nova laparotomia, lavagem da cavidade peritoneal, ressuscitação volêmica, antibioticoterapia e administração de arginina por via subcutânea na dose de 0,95g/Kg logo após o fechamento da cavidade peritoneal. Após seis horas da indução da peritonite, os animais foram mortos e fragmentos de pulmão coletados para análise histológica e morfométrica. **RESULTADOS:** No grupo P-AR (peritonite com arginina) houve redução significativa na contagem nuclear média e nos parâmetros histológicos avaliados no pulmão quando comparado ao grupo P-PL (peritonite com placebo). **CONCLUSÃO:** A administração parenteral de arginina, na dose de 0,95 g/Kg, reduziu a injúria pulmonar precoce em camundongos com peritonite induzida.

PALAVRAS CHAVE: Peritonite; Lavagem Peritoneal; Síndrome de Resposta Inflamatória Sistêmica; Síndrome do Desconforto Respiratório do Adulto; Arginina.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Sepsis due to secondary peritoneal infections is one of the main causes of death in the surgical clinic and in intensive care units. Several factors, such as the immunocompetence of the individual and the virulence of the bacterial strain have been important cause in the increase of the severity of this affection. Among its complications are the involvement of terminal organs, such as lung, with the occurrence of pneumonia and shock lung. In experimental studies, administration of arginine prolonged the survival of animals with induced peritonitis, perhaps by reducing inflammation and stimulating the immune state. **PURPOSE:** To evaluate the pulmonary inflammatory response in mice with induced peritonitis and treated with lavage of the peritoneal cavity, complemented with systemic administration of arginine. **METHOD:** Thirty-two Balb/cAnNCrl mice distributed in the following experimental groups were used: L-PL (n=8), laparotomy and placebo administration; L-AR (n = 8), laparotomy and administration of arginine; P-PL (n=8), induction of peritonitis and administration of placebo; P-AR (n=8), induction of peritonitis and administration of arginine. The animals were anesthetized and the peritonitis was induced by ligature and cecal section technique. The abdomen was then closed, and after ninety minutes, new laparotomy, lavage of the peritoneal cavity, volume resuscitation, antibiotic therapy and subcutaneous administration of arginine at a dose of 0.95 g / kg were performed shortly after closure of the peritoneal cavity. After six hours of induction of peritonitis, the animals were killed and lung fragments collected for histological and morphometric analysis. **RESULTS:** In the P-AR group (arginine peritonitis) there was a significant reduction in the mean nuclear count and histological parameters evaluated in the lung when compared to P-PL group (peritonitis with placebo). **CONCLUSION:** Arginine administration, at a dose of 0.95 g / kg, reduced early lung injury in mice with induced peritonitis.

KEYWORDS: Peritonitis; Peritoneal lavage; Systemic Inflammatory Response Syndrome; Adult Respiratory Distress Syndrome; Arginine.

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 – RELAÇÃO ENTRE O NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA, PODER DO TESTE E TAMANHO DA AMOSTRA POR GRUPO	8
QUADRO 2 – DESENHO DO EXPERIMENTO	9
TABELA 1 – PRESENÇA DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM PULMÕES DE CAMUNDONGOS CONTROLE OU COM PERITONITE INDUZIDA E TRATADOS OU NÃO COM ARGININA PARENTERAL	18
TABELA 2 – CONTAGEM NUCLEAR EM 30 CAMPOS ALEATÓRIOS NO PULMÃO ESQUERDO DE ANIMAIS DO GRUPO LAPAROTOMIA COM PLACEBO (L-PL)	37
TABELA 3 – CONTAGEM NUCLEAR EM 30 CAMPOS ALEATÓRIOS NO PULMÃO ESQUERDO DE ANIMAIS DO GRUPO PERITONITE COM PLACEBO (P-PL)	38
TABELA 4 – CONTAGEM NUCLEAR EM 30 CAMPOS ALEATÓRIOS NO PULMÃO ESQUERDO DE ANIMAIS DO GRUPO LAPAROTOMIA COM ARGININA (L-AR)	39
TABELA 5 – CONTAGEM NUCLEAR EM 30 CAMPOS ALEATÓRIOS NO PULMÃO ESQUERDO DE ANIMAIS DO GRUPO PERITONITE COM ARGININA (P-AR)	40
TABELA 6 – PONTUAÇÃO DE PARÂMETROS HISTOLÓGICOS AVALIADOS NO PULMÃO ESQUERDO DE ANIMAIS DO GRUPO LAPAROTOMIA COM PLACEBO (L-PL)	41
TABELA 7 – PONTUAÇÃO DE PARÂMETROS HISTOLÓGICOS AVALIADOS NO PULMÃO ESQUERDO DE ANIMAIS DO GRUPO PERITONITE COM PLACEBO (P-PL)	42
TABELA 8 – PONTUAÇÃO DE PARÂMETROS HISTOLÓGICOS AVALIADOS NO PULMÃO ESQUERDO DE ANIMAIS DO GRUPO LAPAROTOMIA COM ARGININA (L-AR)	43
TABELA 9 – PONTUAÇÃO DE PARÂMETROS HISTOLÓGICOS AVALIADOS NO PULMÃO ESQUERDO DE ANIMAIS DO GRUPO PERITONITE COM ARGININA (P-AR)	44

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

Figura 1: Técnica Operatória – Laparotomia. A: Antissepsia. B: Laparotomia. C: Inventário da cavidade. D: Laparorrafia	10
Figura 2: Técnica Operatória – Indução da Peritonite. A: Laparotomia mediana. B: Identificação do ceco. C: Ligadura da borda antimesentérica do ceco. D: Incisão na bolsa cecal	11
Figura 3: Técnica Operatória – Tratamento da Cavidade Peritoneal. A: Reabertura da cavidade peritoneal e identificação da bolsa cecal isquêmica B: Lavagem da cavidade peritoneal com 5 mL da solução aquecida a 38°C. C: Secagem da cavidade peritoneal com gaze estéril	12
Figura 4 – Microfotografia mostrando a ruptura alveolar grau 1 e colapso grau 1. em amostras de pulmões de camundongos com peritonite induzida e tratados ou não com arginina. Seta indicando espaço alveolar subpleural com ruptura de septos alveolares. Círculo: foco de colapso alveolar associado	14
Figura 5 – Microfotografia mostrando a classificação da congestão vascular em amostras de pulmões de camundongos com peritonite induzida e tratados ou não com arginina. Aumento de 400X.....	14
Figura 6 – Microfotografia mostrando a classificação do colapso alveolar em amostras de pulmões de camundongos com peritonite induzida e tratados ou não com arginina	15
Figura 7 - Microfotografia mostrando hemorragia grau 1. Setas: hemácias extravasadas para o interior de alvéolos em amostras de pulmões de camundongos com peritonite induzida e tratados ou não com arginina	15
Figura 8 – Microfotografia mostrando colapso pulmonar grau 2 em camundongo submetido a peritonite induzida e tratado com placebo	19
Figura 9 - Microfotografia mostrando congestão vascular grau 2 em camundongo submetido a peritonite induzida e tratado com placebo. Infiltrado polimorfonuclear (círculos) e congestão grau 2 (seta: hemácias)	20
Gráfico 1 – Pontuação da análise histológica, expressa como média \pm desvio-padrão. L-PL versus P-PL, $p=0,02$; P-PL versus P-AR, $p=0,02$	21
Gráfico 2 - Contagem nuclear média no pulmão, expressa como média \pm desvio-padrão. L-PL versus P-PL, $p=0,00002$; P-PL versus P-AR, $p=0,0002$; L-AR versus P-AR, $p=0,01$	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

40X	Quarenta vezes
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
CD14	Cluster of differentiation 14
CD4	Cluster of differentiation 4
CETEA/UFMG	Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais
e-NOS	Óxido nítrico sintetase endotelial
FM/UFMG	Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais
ICAM1	Molécula de adesão intracelular 1
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IFN- γ	Interferon gama
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IM	Intramuscular
i-NOS	Óxido nítrico sintetase induzível com citocinas
LPC	Ligadura e punção do ceco
Ltda	Limitada
n	Número
n-NOS	Óxido nítrico sintetase neuronal
NO	Óxido nítrico
p	Nível de significância
SC	Subcutâneo
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório do adulto
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
SLU	Superintendência de Limpeza Urbana
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

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	1
2 OBJETIVO	5
3 RELEVÂNCIA	6
4 MATERIAIS E MÉTODO.....	7
4.1 Ética.....	7
4.2 Animais utilizados e cuidados dispensados.....	7
4.3 Cálculo do n amostral	7
4.4 Desenho do experimento	8
4.5 Anestesia e técnica operatória	9
4.5.1 Anestesia.....	9
4.5.2 Laparotomia.....	10
4.5.3 Peritonite	11
4.5.4 Tratamento da Cavidade Peritoneal.....	12
4.5.5 Necropsia	13
4.6 Análise Histológica e Morfométrica.....	13
4.7 Análise estatística	17
5 RESULTADOS	18
5.1 Mortalidade	18
5.2 Histologia	18
5.3 Morfometria pulmonar.....	21
6 DISCUSSÃO.....	23
7 CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS	31
APÊNDICE A - TABELAS DE MORFOMETRIA PULMONAR E HISTOLOGIA.....	37
ANEXO A - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA	45

1 INTRODUÇÃO

A sepse decorrente das infecções peritoneais secundárias é uma das principais causas de morte na clínica cirúrgica e em unidades de tratamento intensivo ⁽¹⁾. Apesar da melhoria nos cuidados clínicos e do uso de antimicrobianos de largo espectro, não se tem observado aumento no índice de sobrevida nas infecções peritoneais graves ^(2,3).

Diversos fatores, como a imunocompetência do indivíduo e a virulência da cepa bacteriana também têm sido causa importante do aumento na gravidade da doença nos pacientes com peritonite ⁽³⁾. A falência órgãos terminais, como os pulmões, ocorre em cerca de 74% dos casos e é uma das principais causas de morte nesses pacientes ^(1, 4, 5). Dentre as principais complicações da peritonite, está o acometimento de órgãos-alvos. Como o pulmão é o órgão distante mais frequentemente afetado, pneumonia e pulmão de choque ocorrem com frequência nesses pacientes ^(6, 7). Sendo assim, vários estudos vêm sendo realizados com o objetivo de determinar as causas das alterações pulmonares observadas na sepse abdominal ⁽⁵⁾.

Alguns autores sugerem que as doenças inflamatórias, como a peritonite, podem causar aumento da atividade oxidativa no pulmão, resultando em peroxidação da membrana alveolar; outros sugerem ainda que, na peritonite, há migração persistente de neutrófilos para o pulmão mediada por ação de citocinas secretadas por macrófagos ativadas, provavelmente pela liberação de mediadores exógenos, como as endotoxinas bacterianas ^(8,9). Como consequência desse processo, ocorre lesão alveolocapilar e liberação de radicais livres de oxigênio. O resultado clínico dessa peroxidação é o edema, que pode ser secundário ao aumento da permeabilidade microvascular e à abertura intermitente das junções interendoteliais nas vênulas pós-capilares ^(4, 5, 8).

Apesar de avanços no diagnóstico e tratamento, as taxas de mortalidade permanecem inalterada nos últimos anos ⁽²⁾. Para seu tratamento, a lavagem da cavidade

abdominal com solução salina é o método amplamente utilizado e tem como finalidade a remoção de partículas que são focos de contaminação e que poderiam provocar persistência ou exacerbação do processo inflamatório peritoneal ⁽³⁾.

Nas últimas décadas, permanece a discussão sobre a realização da lavagem da cavidade peritoneal como um dos pilares do tratamento da peritonite. Mikulicz, em 1889, foi o primeiro cirurgião a propor a lavagem da cavidade peritoneal ⁽¹⁰⁾. Ele definiu que a operação precoce, com eliminação do foco infeccioso e a lavagem da cavidade poderiam interromper a cascata inflamatória e aumentar a sobrevida dos pacientes. Seiler *et al.* ⁽¹¹⁾ demonstraram, em uma análise prospectiva de 258 pacientes com peritonite difusa, que 88% destes foram tratados com sucesso seguindo os preceitos de Mikulicz. Atualmente acredita-se que o principal mecanismo pelo qual os pacientes tratados com a lavagem peritoneal e contenção do foco apresentavam melhor sobrevida seja o clareamento e a neutralização das endotoxinas ^(5, 6, 11).

A lavagem da cavidade peritoneal mostrou-se efetiva no tratamento da peritonite, por ser capaz de reduzir a carga bacteriana e inibir sua proliferação, sendo mais eficaz do que não realizar tratamento algum da cavidade, mesmo com o uso de antibioticoterapia sistêmica ^(4, 10). Estudos prévios em modelos animais demonstraram que a lavagem da cavidade peritoneal com soluções salinas a 0,9% ou 3% tem efeito benéfico na injúria pulmonar em modelos de peritonite induzida ^(1, 4, 11).

Porém, existem efeitos comprovadamente negativos nos mecanismos de defesa do peritônio. Dentre eles, foi demonstrado que a lavagem ocasiona apenas redução temporária da população bacteriana e remove mediadores inflamatórios importantes na resposta local contra o agente agressor como proteínas de complemento, proteases, opsoninas e imunoglobulinas, afetando negativamente os mecanismos de defesa peritoneal. 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 ^(1, 4).

Devido à incapacidade de uma mudança significativa na morbidade e mortalidade na peritonite, outros tratamentos vem sendo testados. Em 1988, Madden *et al* ⁽¹²⁾ observaram

que a administração de L-arginina prolongou a sobrevivência em animais submetidos a peritonite experimental, talvez por exercer efeito modulador em células T, aumentando a capacidade de resposta imune. Entretanto, Gonce *et al* (1990) não encontraram resultados semelhantes ⁽¹³⁾. Desde então, alguns trabalhos foram feitos avaliando o papel da L-arginina na imunomodulação na peritonite.

A L-arginina é essencial para a aceleração da ativação de macrófagos nas infecções bacterianas devido à sua capacidade de iniciar as vias intracelulares que determinam a resposta inflamatória induzida por endotoxinas bacterianas ⁽¹⁴⁾. Apesar de macrófagos serem parcialmente estimulados em ausência de L-arginina extracelular, a presença desse aminoácido acelera significativamente a sensibilidade de macrófagos às endotoxinas bacterianas ⁽¹⁴⁾. Essa resposta se dá pelo aumento da produção de compostos ativos do oxigênio, de óxido nítrico e de cálcio ativado, bem como da expressão da oxido sintetase induzida pelo óxido nítrico ⁽¹⁴⁾.

Observou-se, em estudos experimentais, que a administração de L-arginina suplementar entre 2% e 4% da necessidade calórica diária pode reduzir a inflamação e estimular o estado imunitário, talvez por reduzir o estresse oxidativo. Observou-se também que a L-arginina, na dose de 0,95 g/kg/dia, administrada por via parenteral em modelo animal de peritonite, aumentou a imunidade mediada por leucócitos e esplenócitos, melhorando a função hepática e a resposta inflamatória, além da resposta de leucócitos na cavidade peritoneal ⁽¹⁵⁾.

As células orgânicas percebem indiretamente alterações nos níveis de L-arginina por meio de modificações na atividade em várias vias metabólicas ^(14, 15). Entretanto observou-se também que em certas circunstâncias, a administração da L-arginina pode causar produção excessiva de óxido nítrico, um metabólito da L-arginina, o que poderia causar instabilidade hemodinâmica e aumento da resposta inflamatória ⁽¹³⁾.

Diante do exposto, é lícito supor que a administração de L-arginina, como tratamento complementar à lavagem da cavidade peritoneal, reposição volêmica e administração de

antimicrobianos parenterais, pode melhorar a resposta imunitária, reduzindo a agressão pulmonar em modelos de peritonite induzida.

2 OBJETIVO

Avaliar a resposta inflamatória pulmonar precoce em camundongos com peritonite induzida e tratados com lavagem da cavidade peritoneal e L-arginina por via sistêmica.

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. Sabe-se que a lavagem da cavidade peritoneal tem efeito benéfico no tratamento da peritonite e que a administração de L-arginina melhora a mortalidade nos animais com peritonite induzida. Entretanto, ainda é desconhecido o benefício da associação da lavagem peritoneal com administração parenteral de L-arginina e como ela pode tratar eventuais lesões em órgãos alvo, como os pulmões.

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Ética

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais (CETEA/UFMG) e aprovado com protocolo 210 / 2015 (Anexo A).

4.2 Animais utilizados e cuidados

Foram estudados 32 camundongos, da linhagem Balb/cAnNCrl, fêmeas, com 45 dias de vida e pesando aproximadamente 30g. Os animais foram obtidos no Biotério Central da Universidade Federal de Minas Gerais e acomodados no depositário 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.

4.3 Cálculo do n amostral

Em trabalhos anteriores, obteve-se na morfometria de camundongos controle (sem afecção) média da contagem de $765,3 \pm 186$ células por campo. O desenho do experimento

propõe quatro grupos experimentais. Aplicando na plataforma de cálculo do número amostral do Laboratório de Estatística e Epidemiologia do Instituto Dante Pazanezzi (disponível em www.lee.dante.br) as informações acima, obteve-se:

QUADRO 1 – RELAÇÃO ENTRE O NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA, PODER DO TESTE E TAMANHO DA AMOSTRA POR GRUPO

NÍVEL DE SIGNIFICÂNCIA	PODER DO TESTE	TAMANHO DA AMOSTRA POR GRUPO
5%	65%	6
5%	70%	6
5%	75%	7
5%	85%	8
5%	90%	9
5%	95%	11
5%	80%	17
0,1%	80%	11
1%	80%	6

Optou-se por empregar, neste estudo, o poder de teste de 85% para reduzir o número de animais que seriam utilizados, seguindo o princípio dos 3Rs (*reduce, replacement, refinement*).

4.4 Desenho do experimento

Os animais foram distribuídos nos seguinte grupos experimentais:

Grupo laparotomia com placebo (L-PL, n=8) - camundongos submetidos à laparotomia e, após noventa minutos, tratamento da cavidade peritoneal seguida da administração do placebo (solução salina 0,9%) em volume igual ao do aminoácido administrado aos animais dos grupos que receberam a L-arginina. Os animais foram mortos após 6 horas da indução da peritonite.

Grupo laparotomia com arginina (L-AR, n=8) - camundongos submetidos à laparotomia e, após noventa minutos, tratamento da cavidade peritoneal seguida da administração da L-arginina na dose de 0,95 g/Kg, em dose única. Os animais foram mortos após 6 horas da indução da peritonite.

Grupo peritonite com placebo (P-PL, n=8) - camundongos submetidos à indução da peritonite. Tratamento da cavidade peritoneal após noventa minutos da indução e administração de placebo (solução salina 0,9%) em volume igual ao do aminoácido administrado aos animais dos grupos que receberam a L-arginina. Os animais foram mortos após 6 horas da indução da peritonite.

Grupo peritonite com arginina (P-AR, n=8) - camundongos submetidos à indução da peritonite. Tratamento da cavidade peritoneal após noventa minutos e administração da L-arginina na dose de 0,95 g/Kg, em dose única. Os animais foram mortos após 6 horas da indução da peritonite.

QUADRO 2 – DESENHO DO EXPERIMENTO

Grupos n=8	0 hora	90 minutos	6 horas
Laparotomia com placebo (L-PL)	Laparotomia exploradora	Laparotomia exploradora +Lavagem e secagem da cavidade + Antibioticoterapia +Reposição volêmica +Placebo parenteral	Morte
Peritonite com placebo (P-PL)	Indução da peritonite	Ressecção do ceco isquêmico +Lavagem e secagem da cavidade + Antibioticoterapia +Reposição volêmica +Placebo parenteral	Morte
Laparotomia com arginina (L-AR)	Laparotomia exploradora	Laparotomia exploradora +Lavagem e secagem da cavidade + Antibioticoterapia +Reposição volêmica +Arginina parenteral	Morte
Peritonite com arginina (P-AR)	Indução da peritonite	Ressecção do ceco isquêmico +Lavagem e secagem da cavidade + Antibioticoterapia +Reposição volêmica +Arginina parenteral	Morte

4.5 Anestesia e técnica operatória

4.5.1 Anestesia

Os animais foram anestesiados com injeção subcutânea (SC) de uma solução de cloridrato de quetamina, 50mg/Kg/dose (Schering-Plough, Cotia-SP), associado a cloridrato de xilazina, 8 mg/Kg/dose (Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira-SP).

4.5.2 Laparotomia

Todo procedimento cirúrgico foi realizado com material esterilizado em autoclave. Após a verificação do nível anestésico, os animais foram posicionados em placa de isopor revestida de plástico, em decúbito dorsal e imobilizados através de contenção das patas e da cauda com fita adesiva. Realizou-se a antissepsia do abdome com clorexidina degermante a 2% (fig 1A), seguida da laparotomia mediana inferior de dois centímetros de extensão e diérese dos planos (fig. 1B). Foi realizada apenas a identificação do ceco nessa etapa (fig. 1C). Em seguida, procedeu-se à laparorráfia em plano total com sutura em chuleio contínuo, utilizando fio de Catgut 4-0 cromado (fig. 1D). Todos os animais foram novamente acondicionados em caixas coletivas, separandos os animais por grupos. A partir de então, os animais permaneciam com livre acesso apenas à água filtrada.

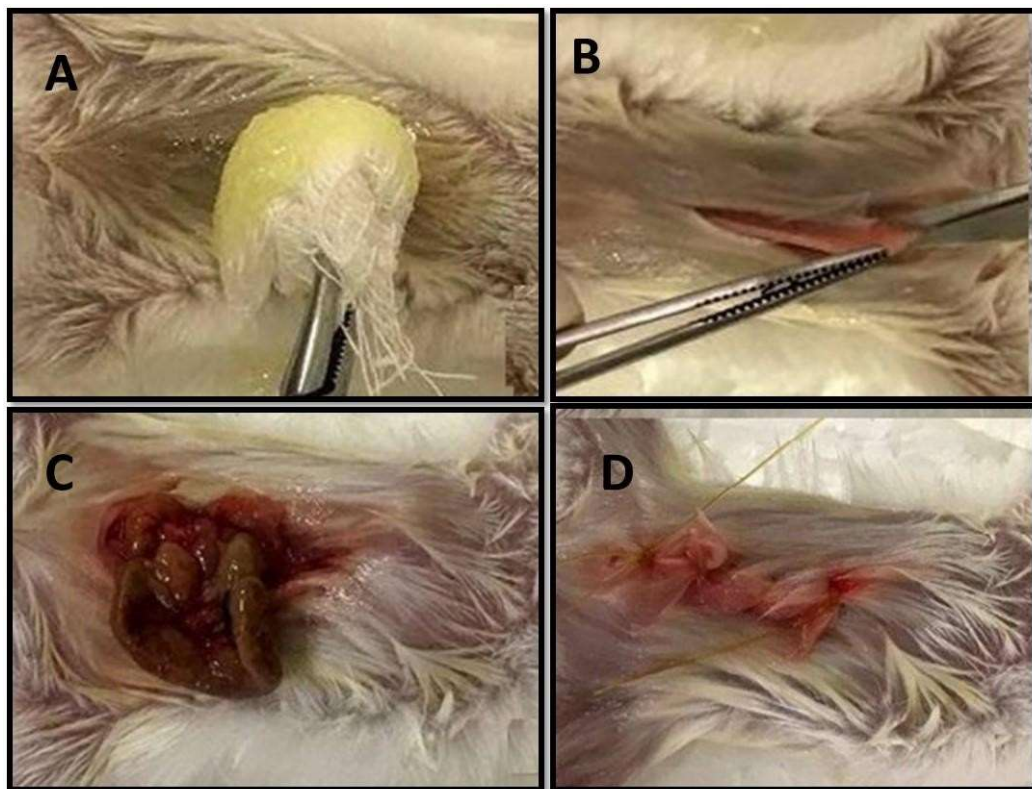


Figura 1: Técnica Operatória – Laparotomia. A: Antissepsia. B: Laparotomia. C: Inventário da cavidade. D: Laparorráfia.

4.5.3 Peritonite

Após verificação do plano anestésico, foi realizada antissepsia da parede abdominal com clorexidina degermante a 2% e então realizada laparotomia mediana de 2 cm, induzindo-se a peritonite pelo método da ligadura e secção do ceco ⁽¹⁶⁾, que consiste na ligadura da borda antimesentérica do ceco, em topografia distal a junção ileocecal, com fio de seda 5-0 e secção da bolsa cecal com tesoura, em uma extensão de dois milímetros. A síntese da parede abdominal foi realizada como no grupo da laparotomia, com sutura continua em plano total, utilizando fio de Catgut 4-0 cromado. Os animais foram acondicionados em caixas, com livre acesso a água.

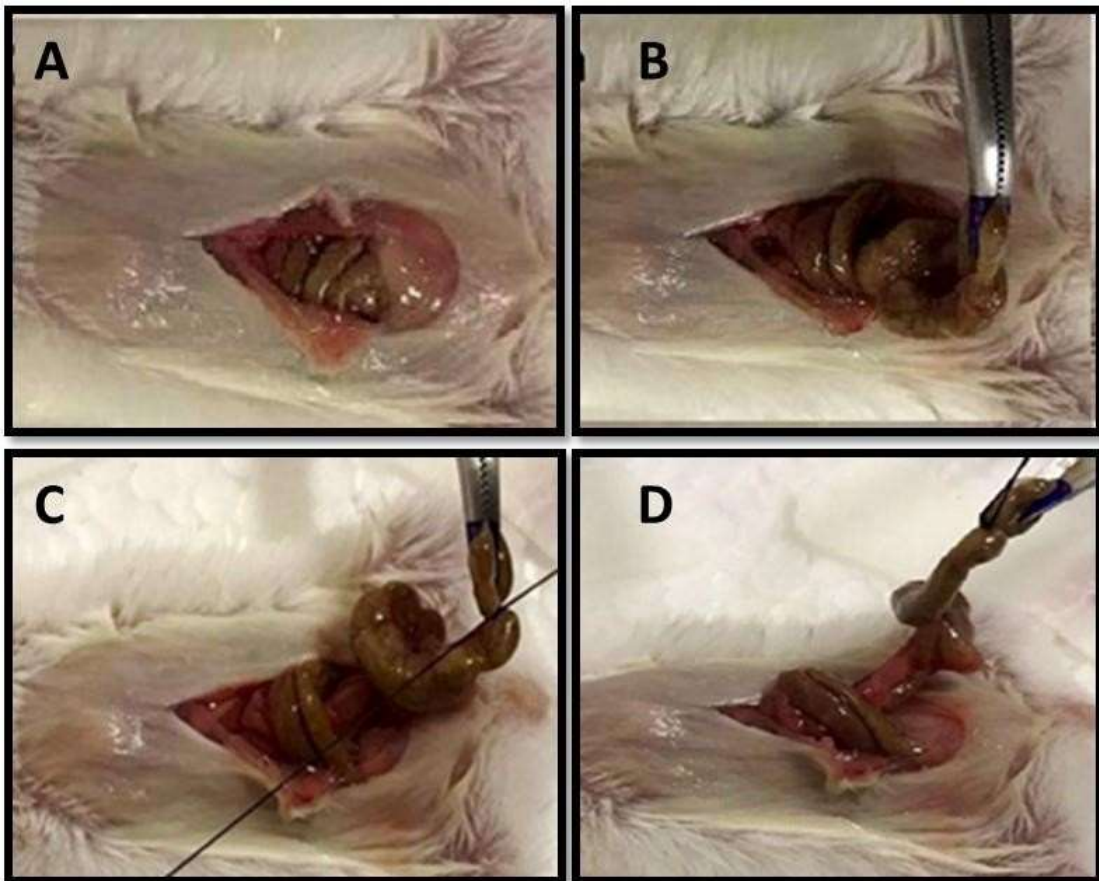


Figura 2: Técnica Operatória – Indução da Peritonite. A: Laparotomia mediana. B: Identificação do ceco. C: Ligadura da borda antimesentérica do ceco. D: Incisão na bolsa cecal.

4.5.4 Tratamento da Cavidade Peritoneal

Após noventa minutos da indução da peritonite ou da laparotomia, os animais foram submetidos a nova laparotomia sob a mesma indução anestésica e técnica operatória descritas nos itens 4.5.2 e 4.5.3. Em seguida, foi realizada ressecção da bolsa cecal isquêmica e o tratamento da cavidade peritoneal com lavagem por 3 vezes com 5 ml de solução salina aquecida (38° C), seguido da secagem da cavidade com gaze estéril e síntese da parede abdominal, conforme descrito no item 4.5.2. Todos os animais receberam ceftriaxona, na dose de 30mg/kg/em tomada única, (Eurofarma, São Paulo-SP) via intramuscular (IM) e administração de 1 ml de solução salina (SC) para reposição volêmica. Os animais dos grupos L-AR E P-AR receberam a L-arginina (SC) na dose de 0,95g/kg (volume de 0,06 ml de uma solução de arginina a 45%, Amphora – Belo Horizonte - MG), e os animais dos grupos placebo receberam igual volume de solução salina a 0,9% (0,06 ml) pela mesma via.

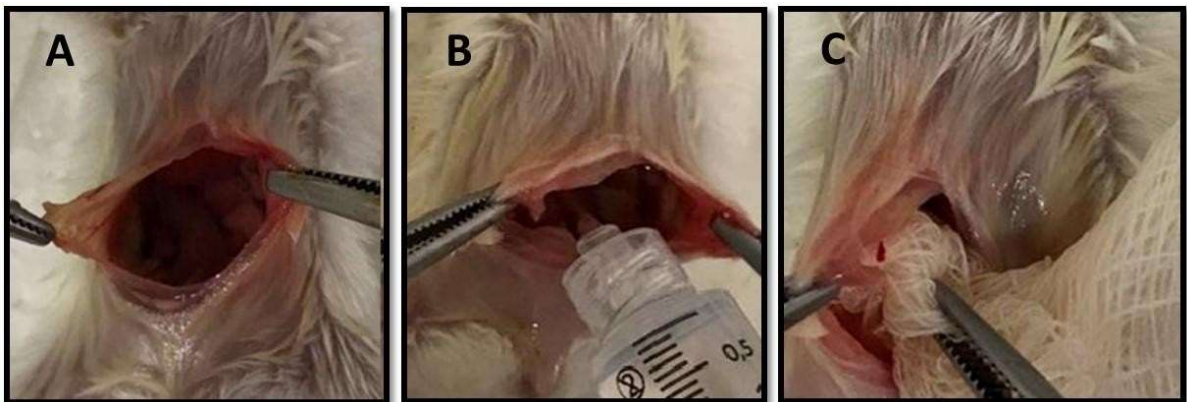


Figura 3: Técnica Operatória – Tratamento da Cavidade Peritoneal. A: Reabertura da cavidade peritoneal e identificação da bolsa cecal isquêmica B: Lavagem da cavidade peritoneal com 5 mL da solução aquecida a 38° C. C: Secagem da cavidade peritoneal com gaze estéril.

4.5.5 Necropsia

Após seis horas da indução da peritonite, os animais foram mortos por sobredosagem de anestésico (200 mg/kg quetamina + 25 mg/kg xilasina SC) e realizada a reabertura da cavidade abdominal, ampliada por meio de uma esternotomia mediana. Em seguida, foi retirado o pulmão esquerdo de cada animal, e os fragmentos armazenados separadamente em frascos com solução de formol a 10%.

As carcaças dos animais foram armazenadas sob congelação 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 de material biológico do município.

4.6 Análise Histológica e 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 histológica foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, sob supervisão do professor Frederico Melo.

As lâminas foram avaliadas por um único examinador que desconhecia a que grupo pertencia cada lâmina. Foram avaliados os seguintes parâmetros, clássicos do processo inflamatório da SDRA: perda da arquitetura, observada pela presença de ruptura dos septos alveolares (fig. 4), congestão vascular (fig. 5), colapso alveolar (fig. 6) e hemorragia intra-alveolar (fig. 6). Esses parâmetros foram pontuados de 0 a 3, sendo considerado 0 ausência do parâmetro, 1 acometimento leve, 2 acometimento moderado e 3 acometimento grave

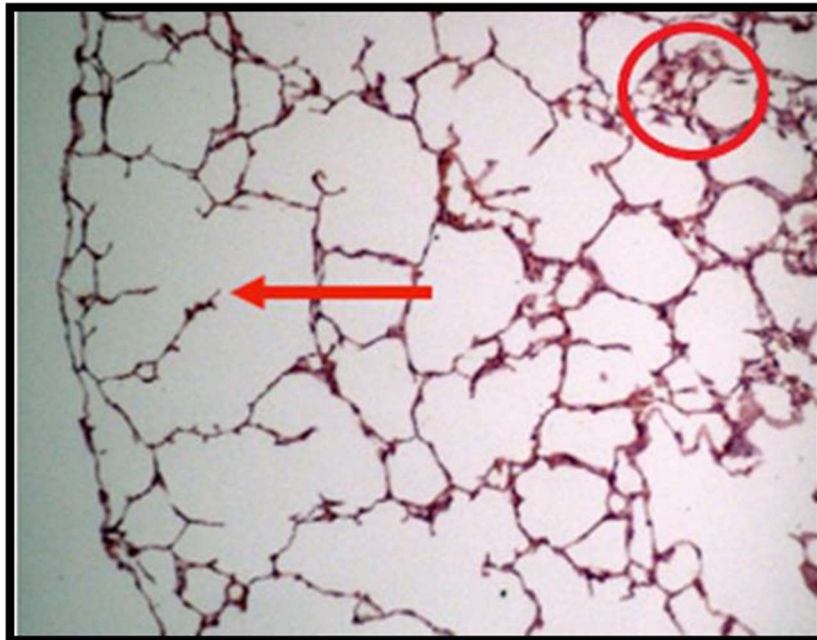


Figura 4 – Microfotografia mostrando a ruptura alveolar grau 1 e colapso grau 1 em amostras de pulmões de camundongos com peritonite induzida e tratados ou não com arginina. Seta indicando espaço alveolar subpleural com ruptura de septos alveolares. Círculo: foco de colapso alveolar associado (Aumento 40x).

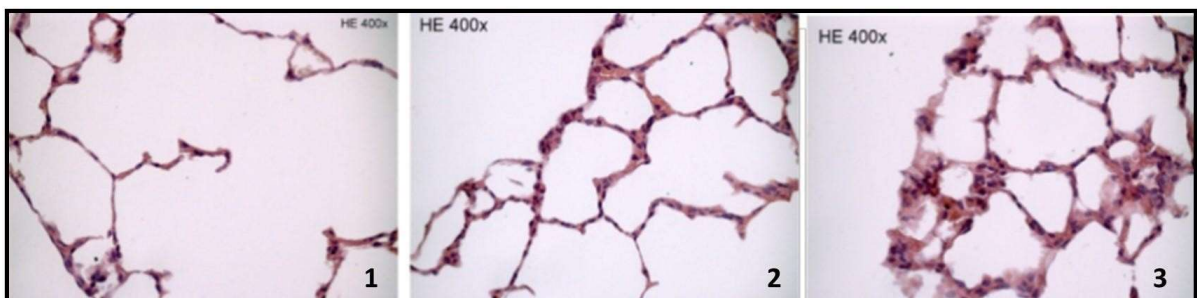


Figura 5 – microfotografia mostrando a classificação da congestão vascular em amostras de pulmões de camundongos com peritonite induzida e tratados ou não com arginina. (Aumento de 400X)

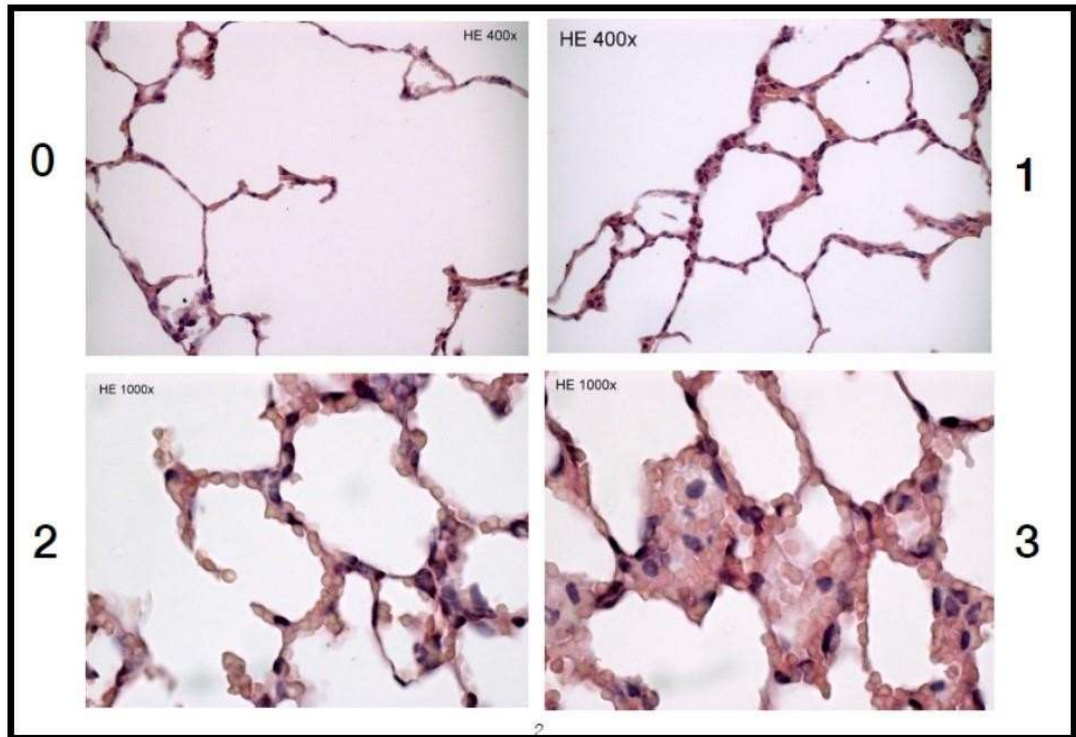


Figura 6 – microfotografia mostrando a classificação do colapso alveolar em amostras de pulmões de camundongos com peritonite induzida e tratados ou não com arginina.

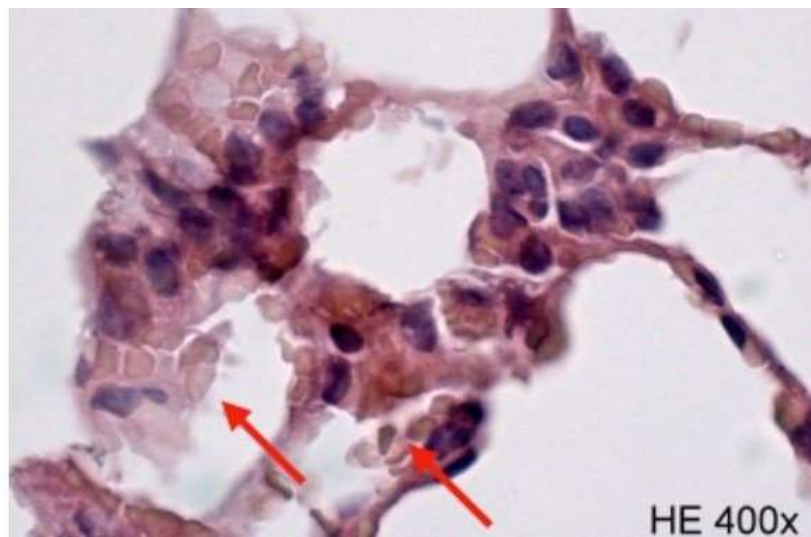


Figura 7 - microfotografia mostrando hemorragia grau 1. Setas: hemácias extravasadas para o interior de alvéolos em amostras de pulmões de camundongos com peritonite induzida e tratados ou não com arginina.

Os pontos obtidos em cada parâmetro foram somados, obtendo-se uma pontuação de inflamação que poderia variar de 0 a 12. A pontuação final obtida por cada animal em cada grupo foi utilizada para obtenção da média e desvio padrão de cada grupo.

A análise morfométrica foi realizada em parceria com o Laboratório de Protozooses do Departamento de Patologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, sob supervisão do professor Marcelo Caliar.

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.

Para a análise do infiltrado neutrofílico do parênquima pulmonar foi utilizada metodologia semelhante à padronizada por Ferreira Junior et al ⁽¹⁷⁾ e Muniz et al ⁽⁵⁾. Todos os cortes histológicos foram vistos com objetiva de 20X com uso do microscópio Axiolab (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) para a digitalização aleatória de 40 imagens por meio da microcâmera Samsung SDC-415, perfazendo uma área total de 1.738.344 μm^2 de parênquima analisado.

Os núcleos de todas as células presentes no parênquima pulmonar foram contados por intermédio de uma sequência de algoritmos do programa KS300 contido no analisador de imagens Carl Zeiss. As técnicas de processamento de imagens foram aplicadas para evidenciar os núcleos das células e, através da segmentação, foram selecionados os pixels dos núcleos de todos os tipos celulares e excluídos aqueles de outras estruturas do corte histológico. Mediante este processo, foi criada uma imagem binária e calculados todos núcleos.

Para análise final da morfometria, os valores de contagem nuclear adquiridos em cada uma das imagens capturadas nos diferentes planos foram agrupados para determinar a contagem celular total de cada animal. Esta análise foi realizada por um pesquisador cego aos grupos examinados. O resultado do número de células/campo por animal foi expresso em média do número de células nas imagens analisadas. Para análise final de cada grupo, foi considerado o valor médio encontrado, por campo, para cada animal e, posteriormente, calculadas a média e o desvio padrão.

4.7 Análise estatística

Os pontos obtidos no somatório dos parâmetros da análise histológica e a contagem dos núcleos obtidos em cada animal na análise morfométrica foram tabulados separadamente no programa Excel (Microsoft®), e as médias e desvios padrões dos grupos do experimento foram calculados empregando-se o teste t de Student com emprego do programa Excel (Microsoft®). Comparando-se os grupos dois a dois, foram consideradas diferenças para $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Mortalidade

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

5.2 Histologia

Dentre os parâmetros histológicos avaliados, a perda da arquitetura classificada como moderado ou grave não foi observado em nenhum animal do grupo L-PL. Nos grupo P-PL e P-AR foi observado em apenas um animal (12,5%) e, no grupo L-AR esteve presente em três animais (37,5%), sem diferença entre os grupos. O colapso alveolar, classificada como moderado ou grave (figura 8), foi observado em somente um animal nos grupos L-PL e P-PL (12,5%), e em nenhum animal dos grupos L-AR e P-AR, sem diferença entre os grupos (Tab1)

TABELA 1 – PRESENÇA DE ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM PULMÕES DE CAMUNDONGOS CONTROLE OU COM PERITONITE INDUZIDA E TRATADOS OU NÃO COM ARGININA PARENTERAL.

GRUPOS	PARÂMETROS HISTOLÓGICOS							
	PERDA DA ARQUITETURA		CONGESTÃO VASCULAR		COLAPSO ALVEOLAR		HEMORRAGIA INTRA-ALVEOLAR	
	0 ou 1	2 ou 3	0 ou 1	2 ou 3	0 ou 1	2 ou 3	0 ou 1	2 ou 3
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
L-PL	8 (100)	0 (0)	6 (75,0)	2 (25,0)	7 (87,5)	1 (12,5)	8 (100)	0 (0)
P-PL	7 (87,5)	1 (12,5)	2 (25,0)	6 (75,0)	7 (87,5)	1 (12,5)	3 (37,5)	5 (62,5)
L-AR	5 (62,5)	3 (37,5)	6 (75,0)	2 (25,0)	8 (100)	0 (0)	7 (87,5)	1 (12,5)
P-AR	7 (87,5)	1 (12,5)	8 (100)	0 (0)	8 (100)	0 (0)	8 (100)	0 (0)

L-PL, Laparotomia tratado com placebo; P-PL, peritonite tratado com placebo; L-AR, laparotomia tratado com arginina; P-AR, peritonite, tratado com arginina.

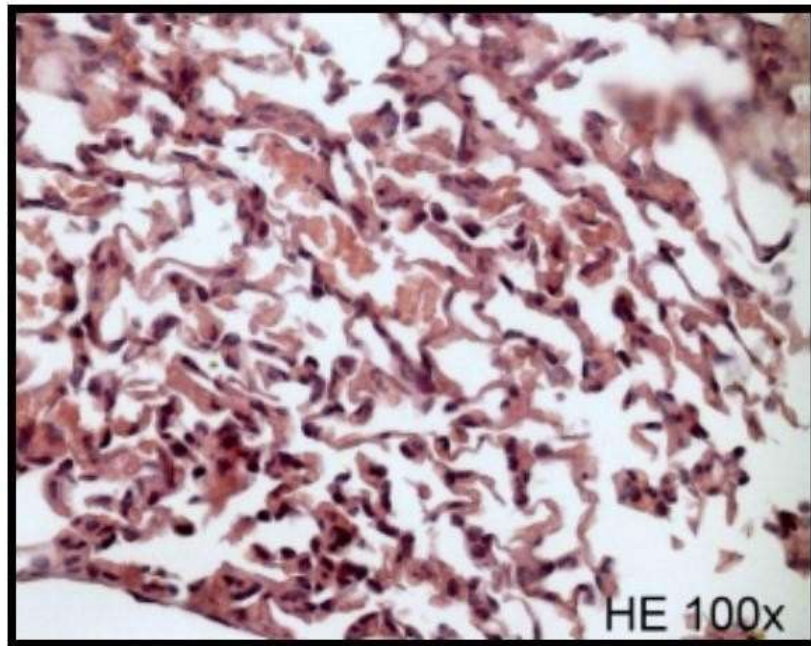


Figura 8 – microfotografia mostrando colapso pulmonar grau 2 em camundongo submetido a peritonite induzida e tratado com placebo

A congestão vascular moderada ou grave (fig 9) não foi vista em nenhum animal do grupo P-AR (peritonite tratado com arginina), dois animais dos grupos L-PL (laparotomia tratado com placebo) e L-AR (laparotomia tratado com arginina), mas esteve presente em seis animais do grupo P-PL (peritonite tratado com placebo), com diferença significativa ($p=0,04$).

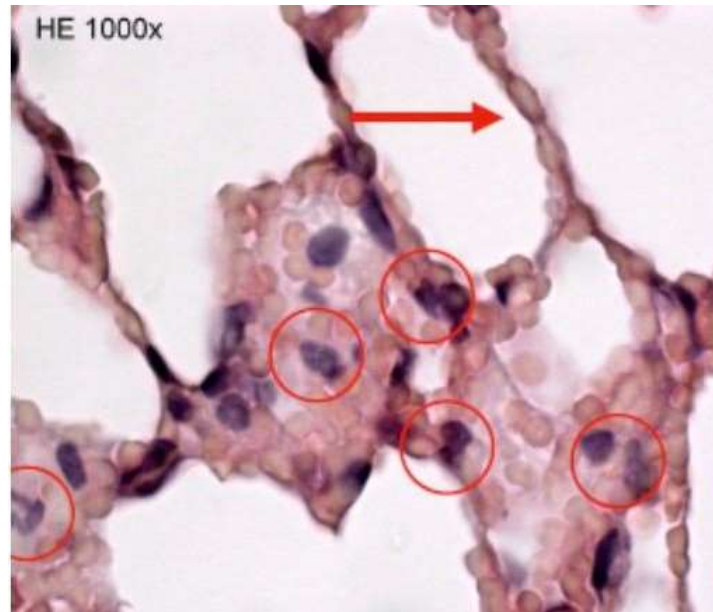


Figura 9 - microfotografia mostrando congestão vascular grau 2 em camundongo submetido a peritonite induzida e tratado com placebo. Infiltração polimorfonuclear (círculos) e congestão grau 2 (seta: hemácias)

A hemorragia intra-alveolar moderada ou grave (fig.9) não foi vista em nenhum animal dos grupos L-PL e P-AR. No grupo L-AR foi observada em apenas um animal, enquanto no grupo P-PL a alteração foi vista em 5 animais ($p=0,007$)

A análise da somatória dos parâmetros histológicos mostrou que, no grupo L-PL, a pontuação média foi de $3,63 \pm 1,77$ (graf.1). No grupo P-PL, a pontuação média dos parâmetros histológicos foi de $5,38 \pm 1,1$, com diferença entre os grupos ($p= 0,02$).

No grupo P-PL, a pontuação média foi de $5,38 \pm 1,1$, e no grupo P-AR foi de $3,38 \pm 1,19$, com diferença entre os grupos ($p= 0,02$).

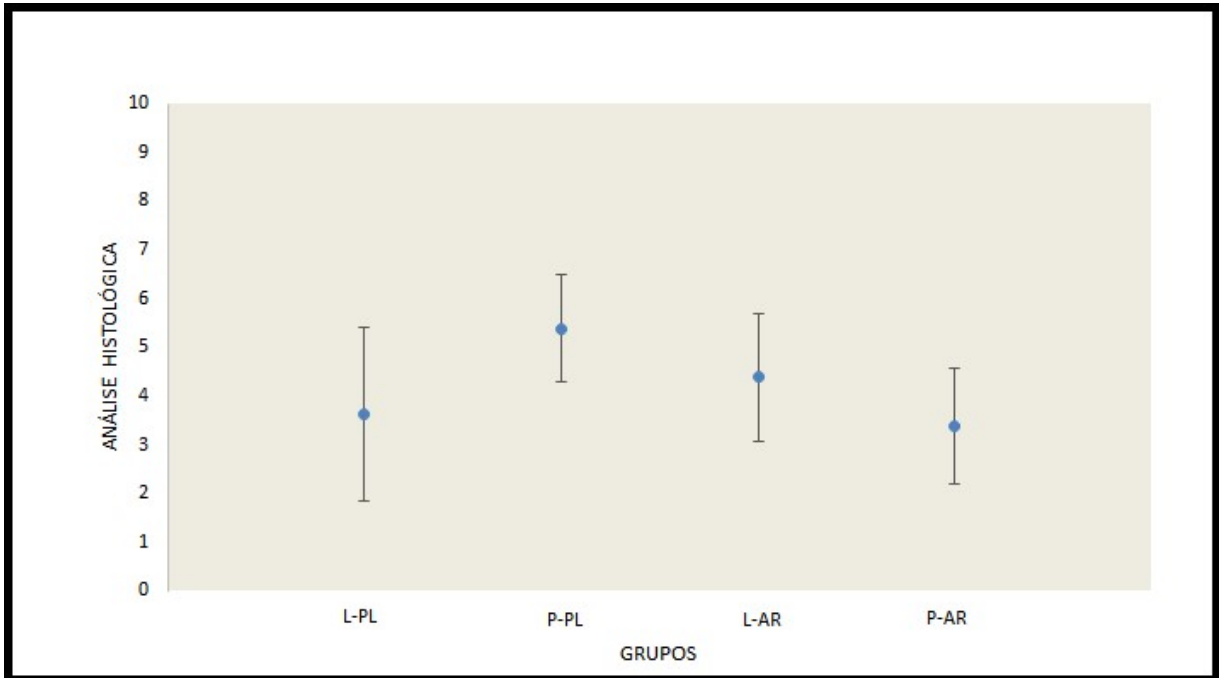


Gráfico 1 – Pontuação da análise histológica, expressa como média \pm desvio-padrão. L-PL versus P-PL, $p=0,02$; P-PL versus P-AR, $p=0,02$.

5.3 Morfometria pulmonar

Os resultados observados na morfometria dos quatro grupos estudados estão representados no gráfico 2.

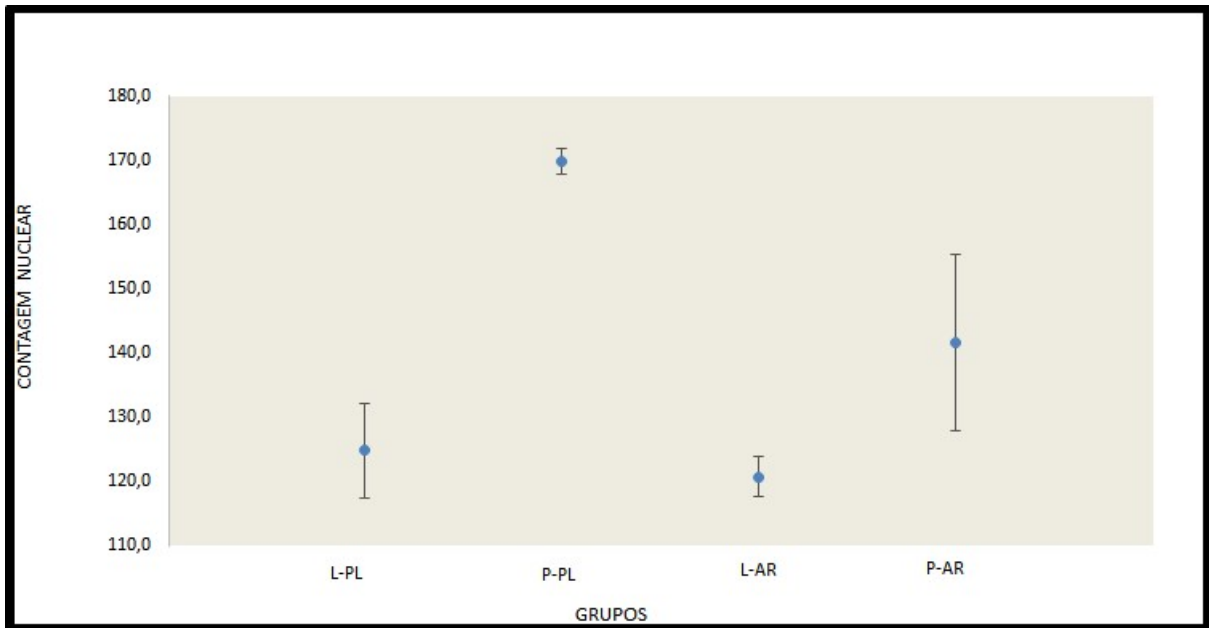


Gráfico 2 - Contagem nuclear média no pulmão, expressa como média \pm desvio-padrão. L-PL versus P-PL, $p=0,00002$; P-PL versus P-AR, $p=0,0002$; L-AR versus P-AR, $p=0,01$

No grupo L-PL, a média de núcleos em 30 campos aleatórios foi de $124,9 \pm 7,4$ (Figura 4). No grupo P-PL, a contagem média de núcleos foi de $169,9 \pm 2$ (Figura 5), com diferença entre os grupos ($p= 0,000022$).

O grupo L-AR apresentou uma contagem nuclear média de $120,8 \pm 3,0$ (Figura 6), sem diferença significativa quando comparado ao grupo L-PL ($p=0,16$).

O grupo P-AR apresentou uma contagem média de núcleos de $141,7 \pm 13,8$ (Figura 7), apresentando diferença significativa quando comparado ao grupo P-PL ($p=0,00025$), e também com diferença quando comparado ao grupo L-AR ($p= 0,0018$).

6 DISCUSSÃO

O peritônio e suas células constitutivas, denominadas células mesoteliais, desempenham papel central na fisiologia da cavidade abdominal, que vai além do deslizamento das superfícies das estruturas que a compõem. Como possui a mesma origem embrionária das células endoteliais, o mesotélio pode expressar marcadores de superfície que garantem funções como promover a migração de neutrófilos, interagir com proteínas da matriz extracelular, apresentar antígenos a células imunes e induzir a produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias ⁽¹⁸⁾. Quando há agressão à homeostase peritoneal, seja por agentes infecciosos ^(1, 9, 19), inflamatórios ⁽⁷⁾ ou irritativos ⁽¹⁸⁾, advém uma resposta local intrínseca e complexa, gerando a peritonite ⁽¹⁹⁾. então interação entre as células mesoteliais e as células do sistema imune que gera a reação inflamatória local, seguida da resposta sistêmica.

Uma das respostas sistêmicas mais exuberante é a estimulação à produção e migração dos neutrófilos, células responsáveis pela resposta imune na resistência do hospedeiro à infecção, uma vez que possuem capacidade de fagocitar e matar bactérias. No entanto, o infiltrado neutrofílico pode causar danos às células endoteliais vasculares através de vários mecanismos que envolvem espécies reativas de oxigênio, enzimas proteolíticas, citocinas inflamatórias e óxido nítrico ⁽²⁰⁾. As reações locais promovem repercussões sistêmicas como choque séptico e síndrome da falência múltiplas de órgãos, pela liberação na circulação de endotoxinas pelas bactérias e de citocinas pró-inflamatórias pelas células fagocitárias. Há também acometimento de órgãos à distância sendo o pulmão o órgão mais comprometido nas infecções sistêmicas ^(21, 22).

A síndrome do desconforto respiratório do adulto (SDRA) foi descrita pela primeira vez em 1967 ⁽²³⁾. Sua mortalidade permanece essencialmente inalterada apesar da crescente sofisticação das técnicas de suporte. A sepse é a causa mais comum de SDRA, geralmente de foco abdominal e com consequente afecção pulmonar. 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. A SDRA é, portanto, cada vez mais vista como o componente pulmonar de múltiplos sistemas de falha orgânica, desencadeada pela resposta sistêmica à sepse ^(20, 24). Histologicamente, a injúria pulmonar aguda precoce se caracteriza por um infiltrado alveolar neutrofílico difuso, com hemorragia, perda da arquitetura original e edema pulmonar.

Em pacientes criticamente doentes, postula-se que a endotoxina, derivada das bactérias gram-negativas aeróbicas no trato gastrointestinal, é responsável pela ativação de cascatas celulares e humorais que resultam nas alterações patológicas observadas na SDRA ^(24, 25). Dentre essas alterações destacam-se o aumento na atividade oxidativa dos pulmões, a peroxidação da membrana basal e secreção de citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos ativadas, gerando aumento na permeabilidade alveolocapilar e afluxo persistente de neutrófilos para os pulmões. Os mecanismos de lesão incluem tanto a injúria direta (tóxica) ao parênquima pulmonar quanto indireta (principal responsável pelas anormalidades fisiológicas) como consequência da ativação de resposta inflamatória aguda e liberação de produtos citotóxicos derivados de leucócitos, como espécies reativas de oxigênio, enzimas proteolíticas, proteínas catiônicas, fatores de crescimento, eicosanoides e citocinas ⁽²⁶⁾. As citocinas pró-inflamatórias produzidas são responsáveis pela perpetuação do processo inflamatório, com aumento da lesão alveolocapilar e consequente edema pulmonar e atelectasia que culmina, em última instância, na hipoxemia ^(27, 28). Há comprovação em dados da literatura de que o infiltrado leucocitário pulmonar em mamíferos aumenta até atingir um platô de noventa minutos a cinco horas após a indução da peritonite ⁽²⁹⁾. 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 ⁽²⁰⁾.

Na sepse abdominal há produção de citocinas responsáveis por manifestações clínicas como febre, hipercoagulação e hipotensão periférica. Os fatores desencadeadores do estímulo à superexpressão de citocinas são componentes da parede celular dos microrganismos, como o ácido lipoteicóico (LTA) e peptidoglicanos, derivados de bactérias gram-positivas (exotoxinas), ou o lipopolissacarídeo (LPS), no caso de bactérias gram negativas (endotoxinas) ⁽³⁰⁾. Essas toxinas se ligam a receptores de membrana em macrófagos e monócitos, como CD-14 e receptor “*tool-like*”, que sinalizam a produção e

liberação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 e IL-6, e algumas citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e IL-4. Outro fator é a expressão de moléculas de adesão celular, como ICAM-1, que no endotélio é responsável por capturar neutrófilos da circulação sistêmica para migrarem para os tecidos inflamados. Existe ainda uma superexpressão de enzimas como a óxido nítrico sintetase (NOS) e a ciclooxigenase, com liberação sistêmica de espécies reativas de oxigênio, gerando dano tecidual grave ^(30, 31, 32, 33).

Para estudo da fisiopatologia da sepse abdominal, bem como medidas visando atenuação da resposta local e sistêmica, são utilizados frequentemente modelos experimentais. A peritonite pode ser induzida em animais de várias maneiras ^(32, 34, 35, 36), como a injeção de lipopolissacarídeos (intraperitoneal ou intravenoso), ligadura e punção do ceco, injeção intraperitoneal de bactérias, dentre outros. Neste trabalho optou-se pela ligadura e secção do ceco, método adaptado do modelo de ligadura e punção do ceco (LPC) que possui eficácia comprovada em vários estudos, manifestando todas as características cardinais da síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SIRS) de forma precoce ^(37, 38, 39). No entanto, existe divergência se a ligadura e secção do ceco isoladamente é capaz de induzir injúria pulmonar ^(40, 41, 42, 43). Isso se deve ao fato desse método apresentar algumas variabilidades: tamanho da incisão a ser realizada (neste trabalho foi padronizado 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). Neste estudo, a exemplo de dados obtidos de estudo de Muniz *et al* ⁽⁵⁾ e Bicalho *et al* ⁽¹⁶⁾, demonstrou-se que a ligadura e secção 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, bem como alterações histológicas mais exuberantes.

O modelo de ligadura e punção cecal (LPC) foi desenvolvido como um modelo simples e reprodutível, que tem sido amplamente utilizado na pesquisa de sepse. As principais vantagens do modelo LPC são a sua simplicidade, similaridade na morbidade e mortalidade e semelhança com problemas clínicos como uma apendicite perfurada ou diverticulite, uma vez que ocorre a contaminação peritoneal por flora mista na presença de tecido desvitalizado ⁽⁴²⁾. No entanto, devido a alguns fatores esse modelo não reflete

completamente a fisiopatologia da sepse em seres humanos ⁽²⁸⁾. Entre as causas dessa discrepância encontram-se 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, o controle ambiental e social (ausência de tabagismo, etilismo) e o tratamento em tempo padronizado e precoce da sepse em animais ^(42, 43, 44).

O tratamento da sepse de foco abdominal baseia-se em 3 pilares: antibioticoterapia sistêmica, controle da fonte da infecção com retirada dos contaminantes grosseiros e ressuscitação volêmica adequada, usualmente com 30 ml de solução cristalóide por quilograma de peso corporal ^(3, 4). Entretanto, diante da morbimortalidade da afecção persistir em níveis preocupantes, justifica-se a investigação de medidas que visem a redução da inflamação sistêmica e, conseqüentemente, da morbimortalidade operatória.

Nas últimas quatro décadas, a L-arginina tem sido usada em uma ampla variedade de condições clínicas e não clínicas ⁽⁴⁴⁾. Em 1988, Madden *et al* ⁽¹²⁾ demonstraram que existe efeito benéfico da L-arginina na sobrevivência de ratos com peritonite grave e letal induzida por ligadura cecal e punção com agulha dupla (LPC). Em 1990, Gonce *et al* ⁽¹³⁾ não reproduziram os mesmos resultados e sugeriram que a suplementação dietética de L-arginina não aumentaria a sobrevivência de cobaias com peritonite experimental. Desde então, inúmeros estudos foram publicados evidenciando efeitos contraditórios em relação a suplementação de L-arginina na sepse por peritonite.

A L-arginina é um aminoácido semi-essencial em seres humanos, pois pode ser sintetizada endogenamente numa quantidade suficiente para atender as necessidades, não sendo necessária na dieta de adultos saudáveis. Durante períodos de estresse metabólico ou traumático, no entanto, a L-arginina é considerada um aminoácido condicionalmente essencial quando o suprimento endógeno é inadequado para satisfazer as demandas metabólicas. A L-arginina vem de 3 fontes primárias, sendo elas: a dieta (a dieta ocidental contribui entre 25 e 30% da L-arginina total presente em a circulação); a síntese endógena (a L-arginina é sintetizada endogenamente via conversão de citrulina em L-arginina no rim); e a degradação de proteínas endógenas. A L-arginina é também um precursor da formação de poliaminas e hidroxiprolina, importantes para o reparo do tecido conjuntivo ⁽⁴⁵⁾.

A L-Arginina é também substrato para a produção de óxido nítrico (NO) e, portanto, aumenta sua disponibilidade sistêmica. Esta reação é realizada por 3 isoformas de NO sintetase: endotelial (eNOS), induzida com citoquinas (iNOS), e neuronal (nNOS). Metabolicamente, a L-arginina pode ter 3 mecanismos centrais. Primeiramente, o NO produzido é uma potente molécula de sinalização intracelular. Em segundo lugar, o NO também é responsável por melhorar a ação bactericida do macrófago, aumentando a sua sensibilidade às endotoxinas e sua conversão do macrófago M1 (inativo) para M2 (ativo). Também, a L-arginina atua como potente modulador imune através dos seus efeitos na proliferação e maturação de linfócitos, bem como diferenciação de linfócitos e macrófagos (44, 46, 46).

A Arginase-1 é uma enzima que degrada rapidamente a L-arginina, e suas concentrações plasmáticas aumentam rapidamente após injúria devido a cirurgia ou traumas (47, 48, 49). Células imaturas da linhagem mielóide são liberadas simultaneamente da medula óssea para a circulação e expressam grandes quantidades de Arginase-1 em sua superfície. O fornecimento endógeno de L-arginina diminui, enquanto que a demanda celular de L-arginina é aumentada (48, 49, 50, 51). A perda acelerada de L-arginina endógena durante a doença grave é provavelmente devido a degradação da Arginase-1 em vários tecidos (45, 46, 52, 53). Além disso, a regulação positiva de iNOS para produzir NO e citrulina contribui apenas minimamente para a depleção de L-arginina (15, 44, 45).

A imunidade mediada por células T desempenha importante papel nas respostas do hospedeiro à infecção (44, 45, 54, 55, 56). A L-arginina proporciona um efeito estimulador no timo e nos linfócitos T, o que aumenta as respostas alogênicas, mitogênicas e antitumorais do hospedeiro (12, 44). A deficiência ou indisponibilidade de L-arginina diminui a proliferação dessas células. Consequentemente, a disfunção linfocitária leva à diminuição de CD-4 circulantes (57), aumento da IL-2, aumento da produção de interferon gama e perda de função do receptor das células T (44). Neste trabalho, avaliamos a presença de infiltrado leucocitário, tanto linfocítico quanto polimorfonuclear, como marcador da resposta imune e inflamação nos pulmões dos camundongos com sepse induzida.

A suplementação com L-arginina é controversa (44, 45, 58). O conceito teórico de que a L-arginina pode promover agravamento do quadro de pacientes cirúrgicos ou criticamente doentes baseia-se no fato desses pacientes serem hemodinamicamente instáveis e com uma

resposta inflamatória aumentada. A hipótese seria que, ao fornecer L-arginina suplementar, ocorreria uma produção de NO adicional, que poderia exacerbar a vasodilatação, já presente em pacientes sépticos, com piora hemodinâmica e hipotensão refratária. Porém, verificou-se que a produção de NO não aumenta significativamente, tampouco é clinicamente relevante, uma vez que a pressão arterial média não diminui com a suplementação de L-arginina em paciente críticos ⁽⁵⁹⁾. Pelo contrário, estudos tem mostrado que a administração intravenosa de L-arginina em pacientes com sepse estimulou a produção de NO ao mesmo tempo que reduziu a degradação de proteínas em todo organismo ⁽⁶⁰⁾. Esses efeitos metabólicos potencialmente benéficos ocorreram sem alterações negativas nos parâmetros hemodinâmicos ⁽⁶¹⁾. Outro dado adicional refere-se ao fato de que a administração de inibidor de NOS em pacientes sépticos aumentou a mortalidade e a frequência de lesões em órgãos alvo, sugerindo que o bloqueio da síntese de NO é deletéria e que sua presença é necessária para vasorregulação ^(44, 57, 62, 63). No presente trabalho, verificou-se os efeitos benéficos da reposição da L-arginina, sem que houvesse aumento da mortalidade ou piora da resposta inflamatória, do contrário, os resultados obtidos mostram que a L-arginina pode diminuir a agressão tecidual e a lesão em órgãos-alvos.

Existe um equilíbrio metabólico entre a L-arginina e um subproduto da L-arginina, a dimetilarginina assimétrica (ADMA) ^(64, 65). Acredita-se que um desequilíbrio na proporção dos dois aminoácidos esteja associada com disfunção em órgãos-alvos. A ADMA é produzida como uma alteração pós-tradução da L-arginina, e tem como efeito principal a vasoconstrição, o que pode atenuar os efeitos vasodilatadores do NO. L-arginina elevada ou ADMA reduzida resultaram em diminuição da mortalidade em pacientes sépticos ^(45, 62, 64).

Esses conceitos tentam explicar o que chamamos de “paradoxo da arginina” ⁽⁵⁹⁾. A plausibilidade biológica do benefício da suplementação da L-arginina pode estar relacionada a possibilidade de reversão de uma combinação de fatores deletérios como a depleção de L-arginina em um estado de sepse, aumento de NO e deslocamento da proporção de L-arginina para a ADMA, levando a uma mudança na vaso regulação e entrega de oxigênio tecidual ⁽⁴⁴⁾.

Quanto às vias de administração, sabe-se que a L-Arginina administrada por via enteral não apresenta toxicidade quando fornecida nas doses disponíveis em formulações comerciais ^(55, 59, 66). A administração parenteral de L-arginina é segura em níveis clínicos,

embora não existam estudos que permitam definir a dose, taxa ou método de infusão associados com melhor resposta ⁽⁴⁴⁾. Há evidências na literatura, que a infusão de L-arginina é segura em pacientes sépticos quando administrada por via parenteral ⁽⁶⁷⁾. Este estudo demonstrou que a dose parenteral de 0,95 g/Kg/dose única ⁽¹⁵⁾ teve efeito positivo na redução da resposta inflamatória pulmonar de camundongos com sepse abdominal induzida.

Novos estudos devem-se ser conduzidos com vistas à determinação da resposta tardia à administração de L-arginina em modelo de sepse abdominal, bem como avaliação da resposta sistêmica determinada pelo uso da L-arginina como imunomodulador na sepse de origem abdominal.

7 CONCLUSÃO

A administração parenteral de L-arginina foi capaz de reduzir a resposta inflamatória pulmonar precoce em camundongos com peritonite induzida.

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):322-327.
2. Qadan M, Dajani D, Dickinson A, Polk Jr HC. 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. Nunes V, Barbuto R, Vidigal P, Pena G, Silvia R, Siqueira L, Caliarí M, Araujo I. Effect of peritoneal cavity lavage with 0.9% and 3.0% saline solution in the lung and spleen of gerbils with induced peritonitis. *Surgical Infections.* 2014; 15: 84-89.
5. Muniz BF, Netto GM, Ferreira MJ, Prata LO, Mayrink CC, Guimarães YL, Caliarí MV, Araujo ID. Neutrophilic infiltration in lungs of mice with peritonitis in acid or basic médium. *Int J Clin Exp Med* 2015;8(4):5812-5817
6. 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;87:255-258.
7. Shields CJ, Winter DC, Manning BJ, Wang JH, Kirwan WO, Redmond P. Hypertonic Saline Infusion for Pulmonary Injury due to Ischemia-Reperfusion. *Arch Surg.* 2003; 138:9-14.
8. Edmiston CE Jr, Goheen MP, Kornhall S, et al. Fecal peritonitis: microbial adherence to serosal mesothelium and resistance to peritoneal lavage. *World JSurg.* 1990;14:176–183.
9. 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.
10. Mikulicz J. Weitere Erfahrungen über die operative behandlung der perforations peritonitis. *Arch Klin Chir (Berl).* 1889; 39: 756-84.
11. Seiler CA, Brügger L, Forssmann U, Baer HU, Büchler MW. Conservative surgical treatment of diffuse peritonitis. *Surgery.* 2000; 127(2): 178-84.
12. Madden HP1, Breslin RJ, Wasserkrug HL, Efron G, Barbul A Stimulation of T cell immunity by arginine enhances survival in peritonitis. *J Surg Res.* 1988 Jun;44(6):658-63.

13. Gonce SJ1, Peck MD, Alexander JW, Miskell PW Arginine supplementation and its effect on established peritonitis in guinea pigs. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1990 May-Jun;14(3):237-44.
14. Pekarova M, Kubala L, Martiskova H, Papezikova I, Kralova S, Baldus S, Klinke A, Kuchta R, Kadlec J, Kuchtova Z, Kolarova H, Lojek A. The unique role of dietary L-arginine in the acceleration of peritoneal macrophage sensitivity to bacterial endotoxin. *Immunol Res.* 2013 May;56(1):73-84.
15. Lee CH, Hsiao CC, Hung CY, Lo HC Combination treatment of parenteral arginine and nitric oxide inhibitor N(G)-nitro-L-arginine methyl ester in rats with peritonitis. *J Surg Res.* 2013 May 1;181(1):99-105.
16. Bicalho PRR, Lima LB, Alvarenga DG, Duval-Araújo I, Nunes TA, Reis FA. Clinical and histological responses to laparoscopically-induced peritonitis in rats. *Acta Cirurgica Brasileira.* 2008 may; 23 (5):456-61.
17. Ferreira Jr M. , Batista S.A. , Vidigal P.V.T. , Cordeiro A.A.C. , Oliveira F.M.S. , Prata L.O. , Diniz A.E.T. , Barral C.M., Barbuto R.C. , Gomes A.D. , Araújo I.D. , Queiroz D.M.M., Caliarí M.V. Infection with CagA-positive *Helicobacter pylori* strain containing three EPIYA C phosphorylation sites is associated with more severe gastric lesions in experimentally infected Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*). *European Journal of Histochemistry.* 2015; 59: 137-146.
18. Yao V, Platell C, Hall JC. Role of peritoneal mesothelial cells in peritonitis. *Br J Surg.* 2003; 90: 1187-1194.
19. Hall JC, Heel KA, Papadimitriou JM, Platell C. The pathobiology of peritonitis. *Gastroenterology.* 1998; 114: 185-196.
20. 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: 156-163.
21. 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.
22. Vincent JL, Puri VK, Carlson RW, Weil MH. Acute respiratory failure in patients with generalized peritonitis. *Resuscitation.* 1983; 10(4): 283-290.
23. Ashbaugh, DG, Bigelow, DB, Petty, TL, Levine, BE: Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2:319, 1967
24. Runcie C, Ramsay G. Intraabdominal infection: pulmonary failure. *World J Surg.* 1990; 14: 196-203.

25. Wheeler AP, Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *Lancet*. 2007; 369: 1553-65
26. Downey GP, Dong Q, Kruger J, Dedhar S, Cherapanov V. Regulation of neutrophil activations in acute lung injury. *Chest*. 1999; 116: S46-S54.
27. Anderson BO, Brown JM, Harken AH. Mechanisms of neutrophil-mediated tissue injury. *J Surg Res*. 1991; 51: 170-9.
28. 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
29. 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.
30. Benjamim CF. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. *Medicina*. 2001; 34: 18-26.
31. Van der Poll T, van Deventer SJH. Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin Am*. 1999; 13(2): 413-426.
32. Poli-de-Figueiredo LF, Garrido AG, Nakagawa N, Sannomiya P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock*. 2008; 30: 53-59.
33. Dellinger RP. Inflammation and coagulation: implications for the septic patient. *Clin Infect Dis*. 2003; 36: 1259-1265.
34. 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; 1: 321-329.
35. 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.
36. Rittirsch D, Hoesel M, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol*. 2007; 81: 137-43.
37. 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.
38. 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.

39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. Esmon CT. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med.* 2004; 32: S219-S222.
43. Hubbard WJ, Choudhry M, Schwacha MG, Kerby JD, Rue LW 3rd, Bland KI, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock.* 2005; 24: 52-7.
44. Rosenthal M, Carrott P, Patel J, Kiraly L, Martindale R. Parenteral or Enteral Arginine Supplementation Safety and Efficacy. *The Journal of Nutrition.* 2016: 1S-7S.
45. Drover J, Dhaliwal R, Wheitzel L, Weischmeyer P, Ochoa J, Heyland D. Perioperative use of Arginine-supplemented Diets: A Systematic Review of the Evidence. *J Am Coll Surg.* 2011; 212: 358-99.
46. Hsiao CC, Lee CH, Tsao LY, Lo HC. The Dose-Dependent Immunoregulatory Effects of the Nitric Oxide Synthase Inhibitor NG-Nitro-L-Arginine Methyl Ester in Rats with Sub-Acute Peritonitis. *PLoS ONE.* 2012; 7(8): 1-9.
47. Darcy C, Woodberry T, Davis J, Piera K, McNeil Y, Chen Y, Yeo T, Weinberg JB, Anstey N. Increased plasma arginase activity in human sepsis: association with increased circulating neutrophils. *Clin Chem Lab Med.* 2014; 52(4): 573-581.
48. Suh H, Wadhwa N, Peresleni T, McNurlan M, Garlick P, Goligorsky M. Decreased L-arginine. During Peritonitis in ESRD Patients on Peritoneal Dialysis. *Adv Perit Dial.* 1997; 13: 205-9.
49. Otto GP, Neugebauer S, Claus RA, Sossdorf M. Arginine metabolism is markedly impaired in polymicrobial infected mice. *Crit Care.* 2012; 16(2): 412.
50. Davis J, Anstey N. Is plasma arginine concentration decreased in patients with sepsis? A systematic review and meta-analysis. *Crit Care Med.* 2011; 39: 380-85.
51. Suh H, Peresleni T, Wadhwa N, McNurlan M, Garlick P, Goligorsky MS. Amino acid profile and nitric oxide pathway in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis: L-arginine depletion in acute peritonitis. *Am J Kidney Dis.* 1997; 29(5): 712-9.

52. Gough M, Morgan M, Mack C, Darling D, Frasier L, Doolin K, Apostolakos M, Stewart J, Graves B, Arning E, Mooney R, Frampton M. The Ratio of Arginine to Dimethylarginines is Reduced and Predicts Outcomes in Patients with Severe Sepsis. *Crit Care Med.* 2012; 39(6):1351-1358.
53. Boisramé-Helms J, Meyer G, Degirmenci SE, Burban M, Schini-Kerth V, Cynober L, et al. "Immunonutrition" Has Failed to Improve Peritonitis-Induced Septic Shock in Rodents. *PLoS ONE.* 2016; 11(1) 1-15.
54. Kang K, Shu XL, Zhong JX, Yu TT, Lei T. Effect of L-arginine on immune function: a meta-analysis. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2014;23(3):351-359.
55. Beale R, Sherry T, Lei K, Campbell-Stephen L, McCook J, Smith J, Venetz W, Alteheld B, Stehle P, Schneider H. Early enteral supplementation with key pharmacconutrients improves Sequential Organ Failure Assessment score in critically ill patients with sepsis: Outcome of a randomized, controlled, double-blind trial. *Crit Care Med.* 2008; 36: 131-44.
56. Wijnands KA, Castermans TM, Hommen MP, Meesters DM, Poeze M. Arginine and Citrulline and the Immune Response in Sepsis. *Nutrients.* 2015; 7: 1426-1463.
57. Hsiao CC, Lee CH, Tsao LY, LO HC. Dose Effects of Chronically Infused Nitric Oxide Synthase Inhibitor NG-Nitro-L-arginine Methyl Ester on Anabolic Response and Arginine Metabolism in Rats with Subacute Peritonitis. *Biol. Pharm.* 2011; 34(2): 177-182.
58. Kalil A, Sevransky J, Myers D, Esposito C, Vandivier R, Eichacker P, Sussla G. Preclinical trial of L-arginine monotherapy alone or with N-acetylcysteine in septic shock. *Crit Care Med.* 2006; 34 (11): 2719-28.
59. Tsikas D, Boger RH, Sandmann J, Bode-Boger SM, Frolich JC. Endogenous nitric oxide synthase inhibitors are responsible for the L-arginine paradox. *FEBS Lett* 2000; 478:1-3.
60. Luiking YC, Poeze M, Deutz NE. Arginine infusion in patients with septic shock increases nitric oxide production without haemodynamic instability. *Clin Sci (Lond)* 2015;128:57-67.
61. Strand OA, Leone AM, Giercksky KE, Skovlund E, Kirkeboen KA. N(G)-monomethyl-L-arginine improves survival in a pig model of abdominal sepsis. *Crit Care Med.* 1998; 26(9): 1490-9.
62. Fukatsu K, Saito H, Han I, Inoue T, Furukawa S, Matsuda T, et al. Nitric Oxide Inhibition Decreases Neutrophil Adhesion at the Inflammatory Site, While Increasing Adhesion in Remote Organs in Peritonitis. *J Surg Res.* 1996; 68: 79-86.

63. Ferrier ML, Combet S, Landschoot M, Stoenoiu M, Cnops Y, Lameire N, Devuyst O. Inhibition of nitric oxide synthase reverses changes in peritoneal permeability in a rat model of acute peritonitis. *Kidney International*. 2001; 16: 2343–2350.
64. Weiss S, Haymond S, Ranaivo H, Wang D, Jesus V, Chace D, Wainwright M. Evaluation of Asymmetric Dimethylarginine, Arginine, and Carnitine Metabolism in Pediatric Sepsis. *Pediatr Crit Care Med* . 2012; 13(4): e210–e218.
65. Shanga HF, Wangb YY, Laib YN, Chiub WC, Yeh SL. Effects of arginine supplementation on mucosal immunity in rats with septic peritonitis. *Clinical Nutrition*. 2004; 23:561–569.
66. Gianotti L, Alexander JW, Pyles T, Fukushima R. Arginine-supplemented diets improve survival in gut-derived sepsis and peritonitis by modulating bacterial clearance. The role of nitric oxide. *Ann Surg*. 1993; 217(6): 644-53.
67. Lo HC, Wu SC, Wang YW, Lee CH. Does pharmacological dose of parenteral arginine have beneficial effect in rats with sub-acute peritonitis? *Pediatr Surg Int*. 2010;26: 625-632.

APÊNDICE A - TABELAS DE MORFOMETRIA PULMONAR E HISTOLOGIA

TABELA 2 – CONTAGEM NUCLEAR EM 30 CAMPOS ALEATÓRIOS NO PULMÃO ESQUERDO DE ANIMAIS DO GRUPO LAPAROTOMIA COM PLACEBO (L-PL).

CAMPOS	1	2	3	4	5	6	7	8
1	137	197	119	169	109	143	143	143
2	113	207	183	151	112	216	143	143
3	133	133	160	110	117	187	163	119
4	225	190	120	137	139	180	149	128
5	136	136	146	133	133	215	148	118
6	161	153	153	161	112	182	212	119
7	142	144	81	92	101	185	143	137
8	147	130	143	68	160	204	158	114
9	132	100	173	86	134	143	140	116
10	118	110	179	94	103	138	143	94
11	193	113	163	96	169	134	109	113
12	141	202	138	78	142	114	90	133
13	189	93	177	95	137	113	143	108
14	148	125	148	129	149	103	107	97
15	131	176	154	138	131	143	181	94
16	84	151	137	131	112	146	150	117
17	151	121	126	94	145	143	143	135
18	112	131	127	93	156	114	143	103
19	163	157	163	109	170	126	123	126
20	134	144	160	112	171	143	126	122
21	121	121	131	104	137	149	98	116
22	168	134	168	100	126	143	118	135
23	178	112	137	117	145	119	138	131
24	112	207	126	111	160	102	162	149
25	151	128	160	110	111	180	157	125
26	56	112	110	98	143	143	139	146
27	110	105	149	133	144	122	143	125
28	111	109	153	63	104	118	192	125
29	119	148	148	86	99	106	165	86
30	211	137	139	90	104	104	154	102
TOTAL	4227	4226	4371	3288	3975	4358	4323	3619
MÉDIA	140,9	140,86	145,7	109,6	132,5	145,26	144,1	120,63

TABELA 3 – CONTAGEM NUCLEAR EM 30 CAMPOS ALEATÓRIOS NO PULMÃO ESQUERDO DE ANIMAIS DO GRUPO PERITONITE COM PLACEBO (P-PL).

CAMPOS	1	2	3	4	5	6	7	8
1	182	142	143	153	169	128	142	141
2	162	157	136	152	140	193	150	168
3	161	173	176	170	171	168	153	170
4	142	135	193	174	143	154	154	156
5	170	160	167	155	128	156	151	181
6	168	157	187	191	153	173	177	141
7	153	187	145	167	159	175	133	149
8	157	163	154	181	138	195	167	151
9	158	175	174	152	181	155	154	168
10	160	188	161	154	170	152	150	148
11	148	145	172	172	175	156	171	152
12	146	148	184	174	157	176	160	139
13	157	173	163	156	176	168	153	160
14	154	177	159	176	182	201	148	158
15	144	174	151	192	170	185	170	143
16	161	181	182	192	150	201	162	163
17	184	190	193	168	151	174	151	170
18	152	147	141	163	165	169	178	158
19	142	138	163	159	201	178	180	160
20	172	147	178	185	155	163	163	156
21	170	158	189	156	174	141	160	148
22	172	161	193	201	168	147	158	163
23	182	152	169	173	158	159	120	165
24	162	144	175	175	172	168	147	155
25	161	174	193	195	159	151	157	149
26	150	175	208	174	177	162	160	147
27	170	174	167	162	143	141	165	138
28	193	159	163	172	173	163	147	144
29	156	156	145	203	174	147	155	140
30	151	189	185	193	159	159	143	133
TOTAL	4840	4899	5109	5190	4891	4958	4679	4614
MÉDIA	161,33	163,3	170,3	173	163,03	165,26	155,96	153,8

TABELA 4 – CONTAGEM NUCLEAR EM 30 CAMPOS ALEATÓRIOS NO PULMÃO ESQUERDO DE ANIMAIS DO GRUPO LAPAROTOMIA COM ARGININA (L-AR).

CAMPOS	1	2	3	4	5	6	7	8
1	143	143	136	143	143	155	131	209
2	84	143	102	108	143	143	129	113
3	111	120	62	143	143	143	141	141
4	124	148	105	95	143	122	125	203
5	99	145	113	75	142	122	163	123
6	106	143	108	169	158	121	146	147
7	177	160	128	148	127	123	108	102
8	114	129	177	107	143	104	123	116
9	116	122	126	161	105	123	144	126
10	138	120	94	111	129	135	157	141
11	109	124	74	107	164	86	177	167
12	82	127	95	139	143	108	140	183
13	113	143	128	110	148	104	126	148
14	131	129	88	137	128	133	134	159
15	85	113	102	115	143	107	141	141
16	155	144	116	107	147	127	115	159
17	143	130	109	114	150	108	157	151
18	114	139	135	150	130	135	155	119
19	203	143	159	144	131	122	126	131
20	138	151	140	111	133	117	146	147
21	113	146	122	130	118	158	136	133
22	78	119	143	114	122	160	145	109
23	145	164	154	89	108	108	116	182
24	99	104	138	124	97	113	150	180
25	59	118	150	129	107	108	141	172
26	162	133	173	104	114	128	175	121
27	140	134	107	121	129	106	131	189
28	142	123	109	151	122	77	185	206
29	137	238	115	121	132	78	203	114
30	152	125	95	67	122	118	208	130
TOTAL	3712	4120	3603	3644	3964	3592	4374	4462
MÉDIA	123,73	137,33	120,1	121,46	132,133	119,73	145,8	148,73

TABELA 5 – CONTAGEM NUCLEAR EM 30 CAMPOS ALEATÓRIOS NO PULMÃO ESQUERDO DE ANIMAIS DO GRUPO PERITONITE COM ARGININA (P-AR).

CAMPOS	1	2	3	4	5	6	7	8
1	118	143	143	157	153	143	143	134
2	136	193	171	115	171	143	146	175
3	165	194	143	184	143	83	192	140
4	125	192	152	179	143	161	136	129
5	81	135	143	161	161	143	136	110
6	83	160	176	174	143	179	141	115
7	103	124	169	165	143	170	153	124
8	113	142	157	184	120	134	134	142
9	156	147	170	147	126	153	135	161
10	103	127	147	217	108	162	135	127
11	126	144	119	143	144	143	133	144
12	68	132	138	185	150	140	146	125
13	111	137	177	169	128	132	138	130
14	108	201	147	177	138	125	140	126
15	71	135	172	134	179	159	120	141
16	103	157	134	193	165	157	139	114
17	90	112	164	165	167	175	141	94
18	95	119	176	163	154	140	129	137
19	106	140	197	181	112	153	119	108
20	90	167	172	117	147	176	130	122
21	132	140	163	153	145	173	173	132
22	106	147	182	144	174	134	137	109
23	150	195	136	130	135	134	150	119
24	126	143	149	124	167	152	165	156
25	105	191	199	152	143	139	153	190
26	106	144	193	133	195	153	138	129
27	106	102	126	128	130	142	126	116
28	122	103	134	149	145	182	138	147
29	124	132	158	142	118	141	143	144
30	97	143	137	125	134	148	131	165
TOTAL	3325	4441	4744	4690	4381	4469	4240	4005
MÉDIA	110,83	148,03	158,13	156,33	146,03	148,96	141,33	133,5

TABELA 6 – PONTUAÇÃO DE PARÂMETROS HISTOLÓGICOS AVALIADOS NO PULMÃO ESQUERDO DE ANIMAIS DO GRUPO LAPAROTOMIA COM PLACEBO (L-PL).

PARÂMETROS HISTOLÓGICOS	1	2	3	4	5	6	7	8
PERDA DA ARQUITETURA	0	1	1	1	1	0	1	1
CONGESTÃO VASCULAR	1	2	1	2	1	1	1	1
COLAPSO ALVEOLAR	0	2	1	1	0	1	1	1
HEMORRAGIA INTRA-ALVEOLAR	1	1	1	1	1	1	1	1
SOMA	2	6	4	5	3	3	4	4

TABELA 7 – PONTUAÇÃO DE PARÂMETROS HISTOLÓGICOS AVALIADOS NO PULMÃO ESQUERDO DE ANIMAIS DO GRUPO PERITONITE COM PLACEBO (P-PL).

PARÂMETROS HISTOLÓGICOS	1	2	3	4	5	6	7	8
PERDA DA ARQUITETURA	1	2	1	1	1	1	1	1
CONGESTÃO VASCULAR	1	2	1	2	2	2	2	2
COLAPSO ALVEOLAR	1	1	0	1	2	0	1	1
HEMORRAGIA INTRA-ALVEOLAR	1	1	2	1	2	2	2	2
SOMA	4	6	4	5	7	5	6	6

TABELA 8 – PONTUAÇÃO DE PARÂMETROS HISTOLÓGICOS AVALIADOS NO PULMÃO ESQUERDO DE ANIMAIS DO GRUPO LAPAROTOMIA COM ARGININA (L-AR).

PARÂMETROS HISTOLÓGICOS	1	2	3	4	5	6	7	8
PERDA DA ARQUITETURA	2	1	2	1	1	2	1	1
CONGESTÃO VASCULAR	2	1	1	2	1	1	1	1
COLAPSO ALVEOLAR	1	0	1	1	0	1	0	1
HEMORRAGIA INTRA-ALVEOLAR	1	1	1	2	1	1	1	1
SOMA	6	3	5	6	3	5	3	4

TABELA 9 – PONTUAÇÃO DE PARÂMETROS HISTOLÓGICOS AVALIADOS NO PULMÃO ESQUERDO DE ANIMAIS DO GRUPO PERITONITE COM ARGININA (P-AR).

ANIMAL	1	2	3	4	5	6	7	8
PARÂMETROS HISTOLÓGICOS								
PERDA DA ARQUITETURA	2	0	1	1	1	1	1	1
CONGESTÃO VASCULAR	1	1	1	1	1	1	1	1
COLAPSO ALVEOLAR	1	0	1	0	0	0	1	1
HEMORRAGIA INTRA-ALVEOLAR	1	0	1	1	1	1	1	1
SOMA	5	1	4	3	3	3	4	4

ANEXO A - CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 210 / 2015, relativo ao projeto intitulado “Avaliação do tratamento com glutaminana na resposta pulmonar e hepática na sepse abdominal”, que tem como responsável Ivana Duval de Araujo, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 09/12/2015. Este certificado expira-se em 09/12/2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 210 / 2015, related to the Project entitled “Evaluation of treatment with arginine response in lung and liver in abdominal sepsis”, under the supervision of Ivana Duval de Araujo, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 09/12/2015. This certificate expires in 09/12/2020.

Cleuza Maria de Faria Rezende
Coordenador(a) da CEUA/UFMG
Belo Horizonte, 09/12/2015.

Atenciosamente.

Sistema CEUA-UFMG

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

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