



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

Paulo Roberto Rodrigues Bicalho

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA À ABORDAGEM
LAPAROSCÓPICA DA PERITONITE INDUZIDA EM RATOS:
COMPARAÇÃO DO PNEUMOPEROTÔNIO REALIZADO
COM CO₂ OU GÁS HÉLIO**

BELO HORIZONTE

2017

Paulo Roberto Rodrigues Bicalho

**RESPOSTA INFLAMATÓRIA À ABORDAGEM LAPAROSCÓPICA DA
PERITONITE INDUZIDA EM RATOS: COMPARAÇÃO DO
PNEUMOPEROTÔNIO REALIZADO COM CO₂ OU GÁS HÉLIO**

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

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

Co-Orientador: Prof. Dr. Rafael Calvão Barbuto

BELO HORIZONTE

2017

Catálogo na edição por:
Crisolino Ferreira da Costa Filho
Bibliotecário: insc. CRB/MG/06: 2713

B583r
2017

BICALHO, Paulo Roberto Rodrigues
Resposta inflamatória à abordagem laparoscópica de peritonite
induzida em ratos: comparação do pneumoperitônio realizado com
CO² e gás hélio.- (manuscrito) / Paulo Roberto Rodrigues Bicalho :
Belo Horizonte: Edição de Tese, 2017.

57 fls. / Ilust.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Facul-
dade de Medicina, Belo Horizonte-MG, 2017.

Orientadora: Ivana Duval de Araújo

1. Peritonite 2. Cavidade 3. Pneumoperitônio I. Araújo, Ivana
Duval de II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de
Medicina III. Título.

CDD: 573.3 (sistema digestivo)
573.4 (sistema endócrino excretor)
573.997 (abdômen)

CDU: 612.32 (estômago)
612.33 (intestino)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: **Prof. Jaime Arturo Ramírez**

Vice-Reitora: **Profa. Sandra Regina Goulart Almeida**

Pró-Reitora de Pós-Graduação: **Profa. Denise Maria Trombert de Oliveira**

Pró-Reitor de Pesquisa: **Prof. Ado Jório de Vasconcelos**

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor da Faculdade de Medicina: **Prof. Tarcizo Afonso Nunes**

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: **Prof. Humberto José Alves**

CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: **Prof. Luiz Armando Cunha de Marco**

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: **Prof. Selmo Geber**

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

Chefe: **Prof. Renato Santiago Gomez**

Sub-chefe: **Prof. Marco Antônio Gonçalves Rodrigues**

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA E OFTALMOLOGIA

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Oftalmologia: **Prof. Tulio Pinho Navarro**

Subcoordenadora do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia e Oftalmologia: **Profa. Vivian Resende**

Membros

Prof. Marco Antônio Percope (Titular)

Prof. Renato Santiago (Suplente)

Prof. Marco Aurélio Lana Peixoto (Titular)

Prof. Sebastião Cronemberger Sobrinho (Suplente)

Prof. Marcio Bittar Nehemy (Titular)

Prof. Daniel Vitor de Vasconcelos (suplente)

Prof. Túlio Pinho Navarro (Titular)

Prof. Cristiano Xavier (Suplente)

Profa. Vivian Resende (Titular)

Prof. Marcelo Magaldi Ribeiro de Oliveira (Suplente)

Taise Mirian Cruz Mosso Ramos (Disc. Titular)

Arthur Adolfo Nicolato (Disc. Suplente)



ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO PAULO ROBERTO RODRIGUES BICALHO

Realizou-se, no dia 18 de outubro de 2017, às 14:00 horas, SALA 526, 5º ANDAR DA FACULDADE DE MEDICINA, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *RESPOSTA INFLAMATÓRIA AO TRATAMENTO LAPAROSCÓPICO DA PERITONITE INDUZIDA EM RATOS, COMPARAÇÃO DO PNEUMOPERITÔNIO REALIZADO COM CO2 OU GÁS HÉLIO.*, apresentada por PAULO ROBERTO RODRIGUES BICALHO, número de registro 2013718033, graduado no curso de MEDICINA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Profa. Ivana Duval de Araujo - Orientadora (UFMG), Prof. Rafael Calvao Barbuto (UFMG) - Coorientador, Prof. Marco Túlio Costa Diniz (UFMG), Prof. Augusto Barbosa Reis (UFMG), Prof. Hélio Plapler (UNIFESP), Profa. Vera Lúcia Angelo Andrade (UNIFENAS).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 18 de outubro de 2017.


Profa. Ivana Duval de Araujo (Doutora)


Prof. Rafael Calvão Barbuto (Doutor)


Prof. Marco Túlio Costa Diniz (Doutor)


Prof. Augusto Barbosa Reis (Doutor)

Prof. Hélio Plapler (Doutor) - Videoconferência


Profa. Vera Lucia Angelo Andrade (Doutora)

*À minha família pelo tempo que nos
privamos de nossas companhias.*

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Ivana Duval de Araújo, pelo acolhimento, carinho e paciência desde os primeiros rascunhos dos projetos, pela orientação desta tese, enfim, por criar dentro do Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia desta Faculdade o ambiente propício para meu crescimento científico, onde o trabalho foi antes de tudo um prazer;

Ao Prof. Dr. Rafael Calvão Barbuto, pelo companheirismo durante o desenvolvimento deste projeto; pelo incentivo em vários momentos de minha trajetória acadêmica desde os primeiros passos em “temas livres”; pela inestimável ajuda no laboratório, com os animais, nas difíceis tarefas do cotidiano das experimentações, despendendo tempo e dedicação para o bom andamento dos trabalhos.

Ao Prof. Dr. Antônio Sérgio Alves, Professor Adjunto da Faculdade de Ciências Médicas de Minas Gerais, onde me formei, que foi o grande incentivador do meu desenvolvimento científico, pela paciência em examinar com carinho os primeiros escritos que abriram os caminhos para esta tese.

Ao Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva, Professor Emérito do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), onde concluí meu mestrado. Foi meu professor na disciplina Seminário Didático Pedagógico I. É grande exemplo para todos os estudiosos em Cirurgia e grande incentivador do meu desenvolvimento científico. Com paciência e deferência pôde revisar o texto final desta tese.

Ao companheiro, colega e amigo, Daniel Gomes de Alvarenga, médico patologista, mestre pela Universidade Vale do Rio Doce (UNIVALE), onde participamos juntos do Núcleo Docente Estruturante (NDE), que aprovou o curso de Medicina daquela instituição. Colega de docência na Universidade Federal de Juiz de Fora *Campus* Governador Valadares, com quem dividi as tarefas de examinar, classificar e tabular os dados histológicos deste trabalho,

Ao Prof. Dr. Fernando de Sá Silva e Prof. Dr. Pedro Henrique Ferreira Marçal, colegas docentes na Universidade Federal de Juiz de Fora *Campus* Governador

Valadares (UFJF/GV) e na Universidade Vale do Rio Doce (UNIVALE), respectivamente. Abnegados docentes que, pelo genuíno interesse no progresso científico, discutiram o emprego das análises séricas deste trabalho, receberam e examinaram as amostras, dedicando todo seu mister para o sucesso deste projeto.

À acadêmica da Faculdade de Medicina da UFJF *Campus GV*, Fernanda Magna Ribeiro, pelo incentivo e auxílio imprescindíveis nas diversas etapas e afazeres no laboratório de cirurgia experimental e formatação deste trabalho.

Ao companheiro Fernando Henrique Pereira, estatístico do Centro de Pós-graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, pela paciência ao examinar e tratar com carinho os dados produzidos pela equipe que subsidiam esta tese. E principalmente pela sensibilidade em responder as mensagens eletrônicas considerando a distância física que separa Governador Valadares de Belo Horizonte.

Aos(às) colegas de trabalho da SERVIENDOS, cuja tolerância no convívio foi testada e aprovada a cada dia deste projeto.

Aos doutores, mestres, colegas professores, servidores técnico-administrativos e discentes dos cursos da saúde: Educação Física, Farmácia, Fisioterapia, Medicina, Nutrição e Odontologia. Também os colegas do departamento básico, pelas opiniões importantes, ideias sensatas e convívio amigável, entre os quais vi surgirem algumas amizades e estreitarem-se outras, tanto na UFMG quanto na UFJF/GV e na UNIVALE. Entre estes, uma menção especial à Mary, servidora da Pós-graduação que pacientemente e com carinho escutava queixas, demandas, lamúrias e então orientava. Por fim, sorriamos bastante. E ao Prof. Dr. Luiz Gonzaga, do Departamento Básico da UFJF/GV, que nos ajudou na obtenção dos animais.

A todos aqueles que de alguma forma participaram da minha formação científica e profissional e na elaboração e execução deste projeto e que involuntariamente omiti.

“Mas estar em meio a essa rerum concordia discors e toda a maravilhosa incerteza e ambiguidade da existência e não interrogar; não tremer de ânsia e gosto da interrogação, nem sequer odiar quem interroga, talvez até se divertindo levemente com este – isto é o que percebo como desprezível (...).”

*(Friedrich Wilhelm Nietzsche) Oeuvres
Philosophiques Complètes*

RESUMO

Introdução: a peritonite é a inflamação de peritônio secundária de um grupo heterogêneo de afecções muito comuns na prática cirúrgica cuja gravidade varia desde infecções leves até quadros catastróficos. A abordagem laparoscópica dessa afecção tem sido empregado com sucesso. Dados da literatura sugerem que o tipo de gás utilizado na realização do pneumoperitônio pode afetar a resposta inflamatória local e sistêmica. **Objetivo:** verificar o grau de inflamação local e o comportamento da resposta imunológica sistêmica em ratos submetidos à ligadura e punção do ceco (LPC) com laparoscopia utilizando-se gás Hélio ou CO₂. **Método:** ratos *Wistar*, machos, foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos. No grupo PC (n=8), fez-se indução da peritonite e realizou-se método laparoscópico utilizando-se CO₂. No grupo CC (n=8), procedeu-se à cirurgia simulada e ao método laparoscópico, utilizando-se CO₂. No grupo PH (n=8), induziu-se peritonite e realizou-se a abordagem laparoscópica, utilizando-se Hélio. No grupo CH (n=8), fez-se cirurgia simulada e realizou-se a abordagem laparoscópica utilizando-se Hélio. Em todos os animais foi feito o tratamento da cavidade com lavagem com solução salina e foi usado antibiótico sistêmico. Após 24 horas foi acessada a cavidade abdominal para análise macro e microscópica, coletado sangue para leucometria e dosagem de cortisol, interleucina IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e os animais foram mortos por sobredose. Os dados foram comparados entre os grupos pelo teste do qui-quadrado e T de student, consideradas diferenças p<0,05. **Resultados:** à macroscopia não se observou abscesso residual. Aderências estavam presentes em todos os grupos sem diferença significativa. Também não houve, à microscopia, diferença entre os grupos quanto a edema de células mesoteliais, exsudato fibrinoso, angiogênese, microabscessos e relação macrófago-fibroblasto (M/F). A concentração sérica de cortisol e TNF α não foi diferente entre os grupos (p=0,17 e 0,18, respectivamente). A concentração de IL-1 foi maior nos grupos com peritonite nos quais se empregou CO₂ (CC) ou Hélio (PH) em relação aos grupos sem peritonite (p<0,001), mas sem diferença entre eles (p=1,0). Resultado semelhante foi encontrado na concentração sérica de IL-6. **Conclusão:** a inflamação local e a resposta imunológica sistêmica em ratos submetidos à LPC e abordados por via laparoscópica com insuflação com CO₂ ou Hélio não mostrou diferença.

Palavras-chave: Sepsis. Imunossupressão. Ligadura e Punção do Ceco. Citocinas e Pneumoperitônio.

ABSTRACT

Background: peritonitis is inflammation of the secondary peritoneum of a heterogeneous group of conditions very common in surgical practice whose severity varies from mild infections to catastrophic. The laparoscopic approach to this condition has been successfully employed. Data from the literature suggest that the type of gas used to perform the pneumoperitoneum can affect the local and systemic inflammatory response. **Objective:** Verify local inflammation and the systemic immune response in rats submitted to laparoscopic cecal ligation and puncture (CLP) using helium or CO₂. **Method:** Male Wistar rats were randomly assigned to four groups. In the PC group (n = 8), peritonitis was induced and a laparoscopic method was performed using CO₂. In the CC group (n = 8), we performed simulated surgery and the laparoscopic method using CO₂. In the PH group (n = 8), peritonitis was induced and the laparoscopic approach was performed using Helium. In the CH group (n = 8), a simulated surgery was performed and the laparoscopic approach was performed using Helium. All animals were treated with saline lavage and a systemic antibiotic was used. After 24 hours the abdominal cavity was accessed for macro and microscopic analysis, blood was collected for leucometria and dosage of cortisol, interleukin IL-1, IL-6 and tumor necrosis factor alpha (TNF α) and the animals were killed by overdose. Data were compared between the groups by qui-quadrado and Student's T test, considered differences p <0.05. **Results:** Residual abscess wasn't observed at macroscopy. Adhesions were present in all groups without significant difference. There was also no difference in microscopy between groups, such as angiogenesis, mesothelial cell edema, fibrinous exudate, presence of microabscesses and macrophage/fibroblast (M/F) ratio. The serum concentration of cortisol and TNF α was not different between the groups (p=0.17 and 0.18, respectively). The concentration of IL-1 was higher in the groups with peritonitis in which CO₂ (CC) or helium (PH) comparing to the groups without peritonitis (p<0.001) but without difference between them (p=1,0). A similar result was observed in the serum concentration of IL-6. **Conclusion:** The local inflammation and systemic immune response in rats submitted to cecal ligation and puncture (CLP) and treated by laparoscopy with CO₂ or helium insufflation showed no difference.

Keywords: Sepsis. Immunosuppression. Cecal ligation and puncture. Cytokines and Pneumoperitoneum.

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Classificação das aderências entre a ligadura e o peritônio ou outras vísceras.....	30
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Número e intensidade das aderências observadas a partir da inspeção da cavidade peritoneal	32
TABELA 2 – Apresentação dos achados histopatológicos do peritônio parietal	34
TABELA 3 – Medianas, valores mínimos e máximos dos níveis séricos de cortisol .	36
TABELA 4 – Medianas, valores mínimos e máximos dos níveis séricos das citocinas: IL-1, IL-6 e TNF α	37

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Laparoscopia mostrando confecção da bolsa cecal em rato <i>Wistar</i>	27
FIGURA 2 – Posicionamento do trocante e dispositivos plásticos para tratamento da peritonite em rato <i>Wistar</i>	28
FIGURA 3 – Aderência entre a ligadura e a parede abdominal (seta preta)	33
<u>FIGURA 4 – Histologia de peritônio parietal mostrando macrófago peritoneal. Grupo PC</u>	
.....	35

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 – Comparação da variação verificada nos valores dos níveis de cortisol aferidos no sangue da veia cava dos grupos PC, CC, PH e CH.....	37
GRÁFICO 2 – Comparação da variação verificada nos valores de IL-1 medidos no sangue da veia cava dos animais dos grupos PP, CC, PH e CH.....	38
GRÁFICO 3 – Comparação da variação verificada nos valores de IL-6 aferidos no sangue da veia cava dos animais dos grupos PC, CC, PH e CH.....	39
GRÁFICO 4 – Comparação da variação verificadas nos valores de TNF α aferidos no sangue da veia cava dos animais dos grupos PC, CC, PH e CH.....	40
GRÁFICO 5 – Comparação da variação verificada nos valores de bastonetes aferidos no sangue da veia cava dos animais dos grupos PC, CC, PH e CH.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Adenosina monofosfato
ANOVA	Análise de variância
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
°C	Graus Celsius
CO ₂	Dióxido de carbono
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FMOS	Falência múltipla de órgãos e sistemas
g/mol	Gramas por mol
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IL	Interleucina
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LPC	Ligadura e punção do ceco
kg	Quilograma
M/F	Relação macrófago/fibroblasto
µl	Microlitros
mg	Miligramas
mm	Milímetros
ng/mL	Nanogramas por mililitros
p	Probabilidade
pg/mL	Picogramas por mililitros
PGE ₂	Prostaglandina E dois
PGI ₂	Prostaglandina I dois ou prostaciclina
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
SIRS	Síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

μm

Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	22
3 RELEVÂNCIA.....	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1 Animais utilizados e cuidados dispensados.....	24
4.2 Delineamento experimental	24
4.3 Indução da peritonite	25
4.4 Tratamento da peritonite.....	27
4.5 Coleta de amostras.....	29
4.6 Histologia	30
4.7 Dosagem do cortisol, IL-1, IL-6, TNF α e leucometria	30
4.8 Estatística	31
5 RESULTADOS	31
5.1. Microscopia.....	32
5.2 Microscopia do peritônio parietal	33
5.3 Quantificação de cortisol, IL-1, IL-6 e TNF α	36
6 DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO.....	49
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

O termo peritonite refere-se a inflamação do peritônio por qualquer causa, enquanto o termo infecção intra-abdominal diz respeito à peritonite causada por microorganismos patogênicos. Como a maior parte das peritonites que cursam com repercussão orgânica, sinais e sintomas como: dor abdominal, febre, taquicardia e taquipnéia são causadas por bactérias, esses termos são usados como sinônimos¹⁻³. Essa inflamação é a expressão final de um grupo heterogêneo de afecções muito comuns na prática cirúrgica, cuja gravidade da apresentação clínica varia consideravelmente, desde infecções de menor repercussão na fisiologia com discreta manifestação clínica ou nenhuma alteração dos dados vitais do indivíduo com possibilidade de tratamento domiciliar até quadros catastróficos com falência múltipla de órgãos e sistemas (FMOS) ou morte^{4,5}.

Uma sequência de eventos biológicos mediados por moléculas e efetivadas por produtos celulares, células, tecidos, órgãos e sistemas inicia-se um a partir do contato de partículas imunologicamente ativas, presentes na superfície de microorganismos patogênicos, com células de reconhecimento presentes na cavidade peritoneal com objetivo de eliminar a partícula invasora e reestabelecer a homeostase local e sistêmica^{6,7,8} e ⁹. Essas partículas chamadas endotoxinas bacterianas entram em contato com as células do sistema imune desencadeando o que é chamado resposta inata⁹. Os primeiros resultados dessa interação são caracterizados no tecido por achados histopatológicos como: vasodilatação, edema e exsudação local, que favorece a incorporação de moléculas imunogênicas, restos celulares e os próprios microrganismos pelo sistema imune. Assim, o material incorporado alcança a circulação sistêmica por via hematogênica e linfática - linfáticos peritoneais que drenam para o ducto torácico⁶. Essa exsudação favorece o aumento na produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e interleucinas (IL) pró-inflamatórias pelos macrófagos peritoneais, o que ocorre precocemente na sepse⁷.

A síndrome de falência múltipla de órgãos e sistemas (FMOS) associada à sepse abdominal parece relacionar-se à incapacidade de células do sistema imune promoverem a fagocitose, com produção aumentada de moléculas pró-inflamatórias e de prostaglandinas vasodilatadoras (PGE2 e PGI2)⁷⁻⁹. Acredita-se que essa resposta seja proporcional à intensidade da lesão tecidual, e presumivelmente é

correspondente às alterações na resposta imunológica do indivíduo¹⁰. Com efeito, uma resposta exagerada à infecção com uma fase pró-inflamatória muito exuberante será prejudicial ao promover *feedback* negativo no sentido de coibir esse estado “hiperinflamatório” que, paradoxalmente, promove um estado de imunossupressão¹¹. A amplitude do ciclo imunossupressor que segue ao estado pró-inflamatório inicial também é proporcional à intensidade da lesão tecidual¹². O comprometimento imunológico a que se faz referência acima corresponde clinicamente às complicações pós-operatórias caracterizadas pelo aumento da morbidade cirúrgica, síndrome da resposta inflamatória sistêmica, sepse e morte¹³.

A laparoscopia tem sido empregada com sucesso no tratamento da sepse de origem abdominal e foi demonstrado não haver diferença na mortalidade pós-operatória e no índice de reoperações precoce quando se compara essa via de acesso com a ressecção cirúrgica tradicional, por laparotomia, em pacientes com peritonite⁵. Especialistas utilizam essa via de acesso desde o fim do século XIX com finalidade de diagnóstico¹⁴. A partir da incorporação de novas tecnologias, do aumento da utilização pelos médicos e do próprio avanço experimentado pela ciência, especialmente pela cirurgia, no século XX ela expande suas potencialidades para procedimentos terapêuticos¹⁴. Verifica-se que a partir do relato da colecistectomia laparoscópica realizada em 1987 por Philippe Mouret em Lyon na França ocorre aumento exponencial do seu uso terapêutico¹⁴. A melhora de indicadores clínicos são atribuídas a essa via de acesso em relação à laparotomia, como: taxas de infecção da ferida cirúrgica menores, necessidade menor do uso de analgésicos no pós-operatório imediato, redução da morbidade considerando cirurgias não complicadas, sem necessidade de re-internação, e, conseqüentemente, períodos mais curtos de internação¹⁵. A laparoscopia clássica exige aumento da pressão intra-abdominal, que é obtida tradicionalmente por insuflação de gás na cavidade peritoneal e denominada: pneumoperitônio. Foi postulado que a resposta endócrino metabólica evocada nos indivíduos submetidos à laparoscopia é influenciada, entre outras coisas, pelo tipo de gás utilizado nesse processo¹⁶. Essa resposta inflamatória, citada por Rosch como sendo influenciada pelo tipo de gás utilizado para confecção do pneumoperitônio¹⁶ acontece a partir de modificações iniciadas por linfáticos, macrófagos e pela migração de neutrófilos polimorfonucleares peritoneais estimulados pela ação de microorganismos patogênicos^{2,3}. Os macrófagos são continuamente renovados a partir da população

de monócitos circulantes e conhecidos por sua intensa atividade antimicrobiana². A ativação dessas células se expressa pela produção de receptores de membrana Fc e C₃, aumento da capacidade fagocitária, apresentação de antígenos da resposta imunológica mediada por linfócitos, além da liberação de outras moléculas importantes na inflamação local e sistêmica como citocinas pró-inflamatórias, prostaglandinas e leucotrienos¹⁷.

Nos casos de peritonite, os macrófagos assumem fenótipo característico, reduzem a atividade da adenosina monofosfato (AMP) cíclico¹⁸ e, sob estímulo de endotoxinas, secretam espontaneamente grandes quantidades de prostaglandinas vasodilatadoras, como a PGE₂ e PGI₂, além de citocinas pró-inflamatórias, como interleucinas 6 e 8 (IL-6 e IL-8), além de TNF α ¹⁹. As moléculas secretadas por essas células são responsáveis pela exsudação peritoneal, ativação das defesas locais, quimiotaxia para polimorfonucleares e estímulo à fagocitose²⁰. Todavia, quando existe produção exagerada de citocinas pró-inflamatória, o processo evolui com lesão tecidual por aumento dos níveis de óxido nítrico, redução da opsonização de bactérias e FMOS^{7,21,22}.

Considerando a importância do macrófago na modulação da inflamação, propõe-se nesse experimento registrar sua atividade verificando os níveis séricos de IL-1, IL-6 e TNF α , com finalidade específica de comparar a influência de dois diferentes gases: gás Hélio e CO₂ na atividade celular no organismo vivo. Em tese, essa produção reflete a funcionalidade dessas células e a capacidade delas de promover a defesa do organismo contra microrganismos patogênicos.

O gás mais utilizado para a insuflação da cavidade abdominal durante o procedimento de laparoscopia é o dióxido de carbono (CO₂)²³. A utilização do CO₂ nos procedimentos de laparoscopia remonta à década de 1920, por Richard Zollinger, que propôs seu uso defendendo tratar-se do gás de eleição devido à sua rápida absorção, à existência de via de eliminação fisiológica e à facilidade na obtenção¹⁴. Ele é um gás inodoro e incolor, com massa molecular de 44,01 g/mol, tem alta solubilidade, com coeficiente de solubilidade de Oswald de 0,5195²⁴, 60 vezes maior que a do Hélio, por exemplo²⁵. No pneumoperitônio com CO₂, há reabsorção desse gás e, conseqüentemente, uma hipercarbia que é diretamente proporcional à pressão intra-abdominal estabelecida para o pneumoperitônio²⁶. Modificações celulares, endócrinas, metabólicas, cardiopulmonares, peritoneais e

imunológicas são esperadas a partir da injeção intraperitoneal de CO₂ com vistas ao estabelecimento de pneumoperitônio²⁷.

O Hélio é um gás inerte, incolor, inodoro, não combustível e relativamente barato, que se supõe ter a mesma capacidade do CO₂ de promover a exposição dos órgãos abdominais, sem os efeitos metabólicos indesejáveis atribuídos a este último, portanto estudos que investiguem a utilização do hélio como alternativa ao gás tradicionalmente utilizado para pneumoperitônio devem ser estimulados²⁷. Contudo, o Hélio é muito menos solúvel que o CO₂, o que se associa a alguns inconvenientes para seu uso clínico²⁵. Destacam-se, entre esses riscos, embolia gasosa e a ausência de uma via de eliminação fisiológica para esse gás. Foram descritos casos de enfisema subcutâneo com duração de cinco dias em pacientes submetidos à colecistectomia videoassistida⁴¹. Já a embolia gasosa assintomática é um evento relativamente frequente, mas eventos trombóticos clinicamente significativos são raros. Tem-se mostrado que a embolia por Hélio é bem mais importante quando comparada com CO₂ e pequena quantidade do gás, como 2 mL/kg, pode ser fatal. Portanto, em pacientes submetidos à laparoscopia utilizando o Hélio deve ser considerado um sistema de monitorização adicional com ecografia transesofágica ou doppler transtorácico, assim como estudo pré-operatório que exclua o diagnóstico de persistência do forame oval⁴². Outro desafio é a dificuldade na obtenção do gás Hélio com a pureza necessária para uso clínico, além das dificuldades legais para aplicação em seres humanos⁴³

Modificações na função do sistema imunológico promovidas pelo pneumoperitônio com CO₂ foram estudadas em modelo animal no qual utilizou-se esse gás à uma pressão de 15 mmHg por 60 minutos com o objetivo de verificar a perfusão intestinal, a liberação de radicais livres do oxigênio e a translocação bacteriana, comparando os microrganismos encontrados no ceco com aqueles recuperados dos linfonodos e órgãos abdominais²⁸. Nesse experimento os resultados encontrados sugerem que a pressão intra-abdominal elevada causa isquemia intestinal e liberação de radicais livres do oxigênio e facilita a translocação bacteriana²⁸. Outro estudo que também mostrou que procedimentos laparoscópicos reduzem a capacidade do indivíduo se defender de microrganismos patogênicos foi realizado inoculando amostras de *Listeria monocitogenes* em ratos e verificando-se que o pneumoperitônio com CO₂ diminuem a resposta imunológica intraperitoneal e impõe dificuldades à eliminação dos microrganismos nos ratos que receberam

CO₂²⁹. Outros experimentos que estudaram a produção de citocinas pró-inflamatórias sugerem também existir inibição da atividade do macrófago, mesmo que transitória e que o mecanismo responsável por esse efeito está relacionado à diminuição do potencial hidrogeniônico (pH) do meio intra e extracelular³⁰⁻³³.

A inibição da resposta inflamatória após a cirurgia laparoscópica deve ocorrer e ser mediada pela acidificação verificada nas células peritoneais, sendo protetora para os indivíduos que se submetem ao procedimento por essa via de acesso³⁴⁻³⁶. Por outro lado, níveis de TNF α menos pronunciados foram considerados um efeito deletério verificado nos indivíduos submetidos ao pneumoperitônio com CO₂ e sua ocorrência associou-se a elevado número de metástase peritoneais e incisionais em modelo animal³⁷. Foi encontrada inflamação peritoneal discretamente aumentada em ratos sépticos que receberam CO₂ e verificaram-se níveis de bacteremia inferiores em ratos que receberam Hélio³⁸. Também se registrou mortalidade semelhante entre animais submetidos à peritonite, por inoculação de bactéria viva e bário, e laparotomia ou pneumoperitônio com CO₂, porém menor que os do grupo que não recebeu CO₂ e concluiu-se a partir dessa experimentação que o procedimento de insuflação da cavidade com CO₂ tem efeito inibidor na evolução da inflamação peritoneal induzida por *E. coli*, esse efeito foi atribuído também a propriedades bacteriostáticas do CO₂³⁵. A atividade inflamatória medida pela atividade da mieloperoxidase foi comparada em grupos de animais com pancreatite e submetidos à laparotomia e pneumoperitônio com CO₂, cujos resultados foram controversos. Níveis semelhantes da enzima foram descritos nos dois grupos³⁹. Outros autores relataram benefício do procedimento de insuflação com níveis de mieloperoxidase reduzidos no grupo submetido ao pneumoperitônio com CO₂ em relação ao grupo controle⁴⁰.

Ensaio clínico têm revelado que a utilização do Hélio para promover pneumoperitônio é relativamente segura e exerce menos influência na regulação ácido-base dos pacientes^{41,44,45}. Contudo o experimento realizado em suínos evidenciou que as alterações fisiológicas induzidas pelo pneumoperitônio parecem ter estreita relação com o desenvolvimento de acidose metabólica⁴⁶. Observou-se nesse estudo que as alterações hemodinâmicas notadas cursam com hipofluxo renal; independem do gás utilizado para confecção do pneumoperitônio se Hélio ou CO₂; promovem redução no débito cardíaco; pioram a perfusão; agravam o edema

tissular; e resultam em aumento de metabólitos do processamento anaeróbico, em particular do ácido láctico, conseqüentemente, com redução do pH⁴⁶. Considerando-se dados desse experimento⁴⁶, pressupõe-se que as alterações de pH se relacionem mais à pressão intraperitoneal do que às propriedades do gás utilizado no procedimento. Porém, outros autores afirmam que a acidificação peritoneal promovida pelo pneumoperitônio com CO₂ é um atributo específico desse gás e que não é abolida nem mesmo pela intubação traqueal e hiperventilação que seria capaz de eliminar pela via pulmonar parte do CO₂ responsável pela acidose⁴⁷. Independente da origem, a acidose encontrada em indivíduos submetidos à laparoscopia^{46,47} é, segundo Hanly (2005), responsável pelos efeitos benéficos associados à cirurgia minimamente invasiva clássica quando comparada à laparotomia ou quando se confronta os resultados do procedimento tradicional, pneumoperitônio com CO₂, com o mesmo procedimento utilizando Hélio⁴⁸. Foi demonstrado que a preservação da resposta imunológica foi mais efetiva no grupo que utilizou Hélio quando comparado àquele que usou CO₂, mas a medida de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, foi semelhante⁴⁸.

Em modelo experimental que estudou o impacto do pneumoperitônio de CO₂ ou Hélio comparando-os com a laparotomia, encontrou-se que o procedimento utilizando CO₂ aumenta a sobrevida após a sepse abdominal e pode ser benéfico em condições de contaminação bacteriana da cavidade abdominal³⁶. Também se verificou mais sobrevida no grupo de animais submetidos à insuflação da cavidade abdominal com CO₂ em modelo de sepse induzida por lipopolissacarídeo (LPS), o que não foi observado na insuflação da cavidade com Hélio ou ar³⁴. Além disso, nesse estudo o pneumoperitônio com CO₂ promoveu aumento da IL-10 e redução do TNF α , sugerindo que esse procedimento reduziu a mortalidade provavelmente por um mecanismo de retroalimentação negativa da IL-10-mediada pelo TNF α ³⁴. Esse efeito está associado à acidificação da cavidade peritoneal, seja por insuflação abdominal com CO₂ ou por instilação local de ácido tamponado, e o nível de acidificação do meio correlaciona-se com o grau de supressão da resposta inflamatória. O Hélio é um gás inerte e portanto segundo Hanly (2006) teria uma capacidade inferior ao CO₂ de promover a acidificação da cavidade peritoneal e conseqüentemente de conseguir efeito protetor sobre a mortalidade⁴⁹.

Considerando a hipótese que existe diferenças comportamento dos dois tipos de gases utilizados para insuflação da cavidade abdominal como as relatadas

relatadas acima empreendeu-se essa experimentação que teve por objetivo comparar o efeito do gás sobre a resposta inflamatória.

2 OBJETIVOS

Verificar a intensidade da resposta inflamatória peritoneal e sistêmica em ratos com sepse de origem abdominal e tratados com irrigação de solução fisiológica a 0,9% pela via laparoscópica utilizando-se dois gases diferentes, CO₂ e Hélio, para confecção do pneumoperitônio.

3 RELEVÂNCIA

A sepse abdominal continua sendo uma condição associada a alta morbidade e mortalidade. Apesar de recentes progressos na compreensão dos eventos a essa afecção, verifica-se que o número de pacientes acometidos vem aumentando e os índices de recuperação vêm se alterando pouco. Assim, muitos aspectos relacionados à fisiopatologia da sepse abdominal e repercussões de seu tratamento merecem mais elucidação, visando determinar tratamentos mais eficazes com menor dano colateral. Tendo em vista a crescente utilização da cirurgia laparoscópica em seu tratamento, os resultados do presente estudo podem vir a ser úteis na compreensão da resposta orgânica ao tratamento cirúrgico de pacientes com sepse de origem abdominal que tenha indicação de tratamento cirúrgico no curso de sua evolução.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Segue abaixo um descritivo dos materiais e dos métodos utilizados durante a elaboração da pesquisa e confecção da presente tese.

4.1 Animais utilizados e cuidados dispensados

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFMG) sob o registro número 417/2015. Utilizaram-se 32 ratos *Wistar*, machos, provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-UFMG) e acomodados no depósito de pequenos animais da Faculdade Medicina da UFMG pelo período de aclimação de 20 dias antes da experimentação.

Todos os animais foram acomodados em gaiolas coletivas de poliuretano, com população máxima de seis animais por gaiola, com dimensões de 20X30X45 cm, tampas de aço inoxidável, forradas com serragem de madeira branca e atóxica. Utilizou-se recipiente para água graduado, de polietileno e atóxico. As gaiolas foram colocadas em ambiente seco, à temperatura ambiente, com fotoperíodo de 12 horas (claro/escuro), água potável e ração padrão para ratos (NOVILABE/MERCAVET S/A.) oferecido livremente em quantidades recomendadas para a espécie/idade.

4.2 Delineamento experimental

Os animais foram aleatoriamente distribuídos em quatro grupos experimentais:

PC (n=08), confecção pneumoperitônio com CO₂, indução da peritonite, tratamento padrão sob laparoscopia com CO₂;

CC (n=08), confecção de pneumoperitônio com CO₂, laparoscopia, tratamento padrão sob laparoscopia com CO₂;

PH (n=08), confecção pneumoperitônio com Hélio, indução da peritonite, tratamento padrão sob laparoscopia com hélio;

CH (n=08), confecção de pneumoperitônio com Hélio, laparoscopia, tratamento padrão sob laparoscopia com Hélio.

4.3 Indução da peritonite

Os animais foram retirados do Centro de Bioterismo no dia do experimento, identificados, pesados e seus dados anotados em planilha do *Microsoft Office Excel Home Business* 2016.

Para anestesia dos animais, as drogas foram previamente diluídas, o animal contido pelo pesquisador e um auxiliar fez a aplicação. Utilizou-se para a anestesia a associação de quetamina (Cristália Prod Quim Farmac Ltda. Itapira SP) na dose de 40 mg/kg em associação com xylazine (Schering-Plough, Cotia SP) na dose de 8 mg/kg. Os anestésicos foram administrados por via intramuscular no dorso posterior à esquerda. Todos os animais receberam também 30 mg/kg de Ceftriaxona (ROCEPHIN, Roche), via intramuscular no dorso posterior à direita em dose única. No pós-operatório ofereceu-se por gavagem gástrica dose única diária de ibuprofeno correspondente a 10 mg/kg durante o período de observação⁵⁰.

Em seguida, o animal foi posicionado em placa de cortiça em decúbito dorsal e imobilizado com a contenção das patas e da cauda com fita adesiva para indução da peritonite segundo modelo já estabelecido⁵¹. Foi realizada tonsura da pelagem da parede abdominal anterior e antisepsia da região com solução de clorhexidine a 2%. Para o procedimento cirúrgico utilizaram-se luvas e instrumentos cirúrgicos estéreis e um trocar de 2 mm foi colocado na linha mediana a 3 cm do apêndice xifoide para introdução da óptica. Fez-se incisão de 6,0 mm na fossa ilíaca

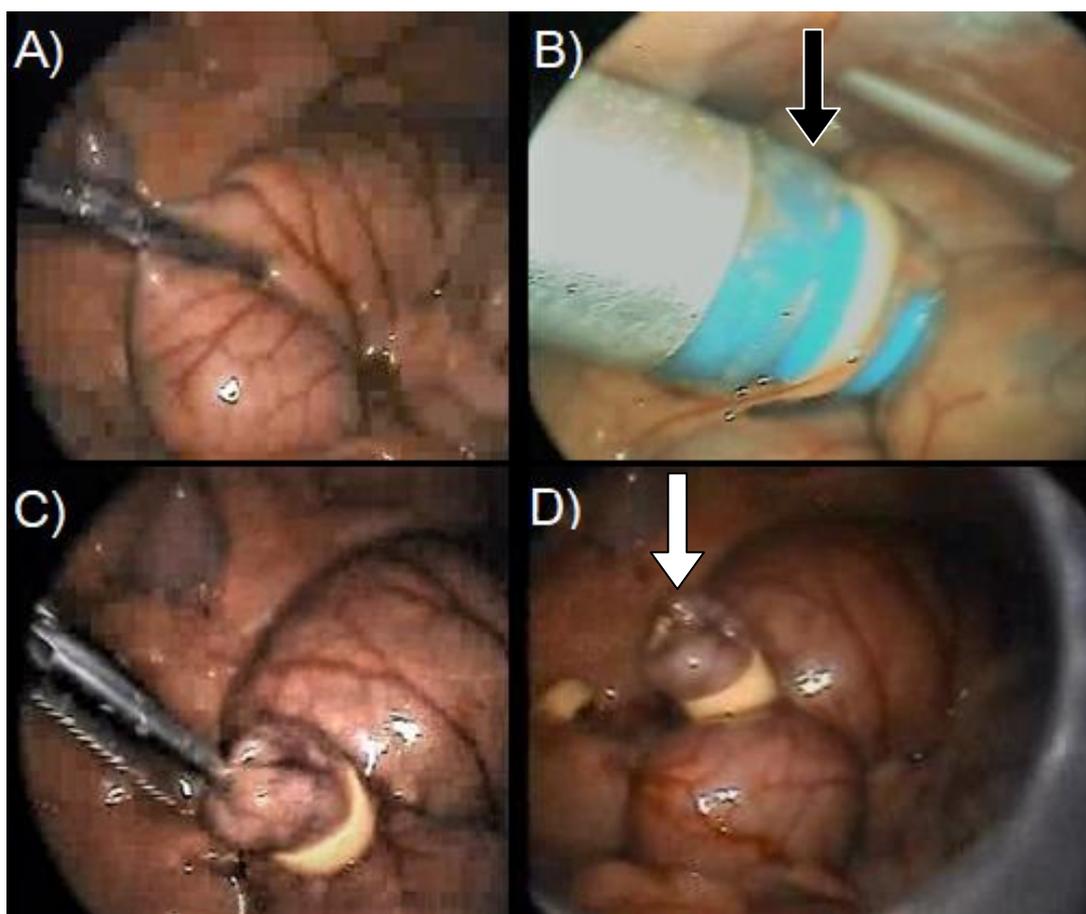
esquerda, onde se posicionou dispositivo de ligadura elástica. Foi realizada sutura com fio catégute cromado 4.0 no contorno do trocarte e do dispositivo de ligadura elástica para impedir o escape de ar.

Em seguida, confeccionou-se pneumoperitônio até 12 mmHg com o gás correspondente ao grupo estudado, por insuflador automático eletrônico desenvolvido pelo grupo de pesquisadores, cujas especificações técnicas seguem os padrões do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO). O insuflador foi conectado a um jelco número 14 posicionado no hipocôndrio direito do animal, propiciando o monitoramento: da pressão intraperitônea; do volume de gás infundido; e da determinação da velocidade do fluxo de infusão.

Utilizando-se videolaparoscópio convencional e óptica 0° e 2 mm, fez-se o inventário da cavidade com identificação do ceco. Por meio do dispositivo de ligadura introduziu-se pinça de preensão com 20 cm de comprimento, compatível com trocarte de 2 mm, com a qual o ceco foi pinçado e tracionado 10 mm para o interior da cânula do dispositivo. Disparou-se a banda elástica do dispositivo, formando um estrangulamento semelhante a um divertículo. Essa bolsa cecal foi perfurada seccionando-se 30% da circunferência da mesma com tesoura de 20 cm de comprimento, compatível com trocarte de 2 mm, e introduzida pela cânula do dispositivo de ligadura, permitindo extravasamento de conteúdo fecal para a cavidade abdominal (FIG. 1).

No grupo-controle foi seguida a metodologia até a identificação do ceco, com sua preensão, sem que fosse feita a ligadura com confecção da bolsa e a secção da parede cecal. Passados 15 minutos, o pneumoperitônio foi desfeito, retirados o trocarte e o dispositivo de ligadura, as incisões suturadas com fio catégute cromado 4-0 e o animal acomodado em gaiola apropriada, conforme descrito anteriormente.

FIGURA 1 – Laparoscopia mostrando confecção da bolsa cecal em rato *Wistar*



- A) Prensão do ceco do rato. B) Pinçamento e tração do ceco para o interior do dispositivo de ligadura elástica (seta preta). C) Secção de 30% da circunferência da bolsa cecal. D) extravasamento de conteúdo fecal para cavidade abdominal.

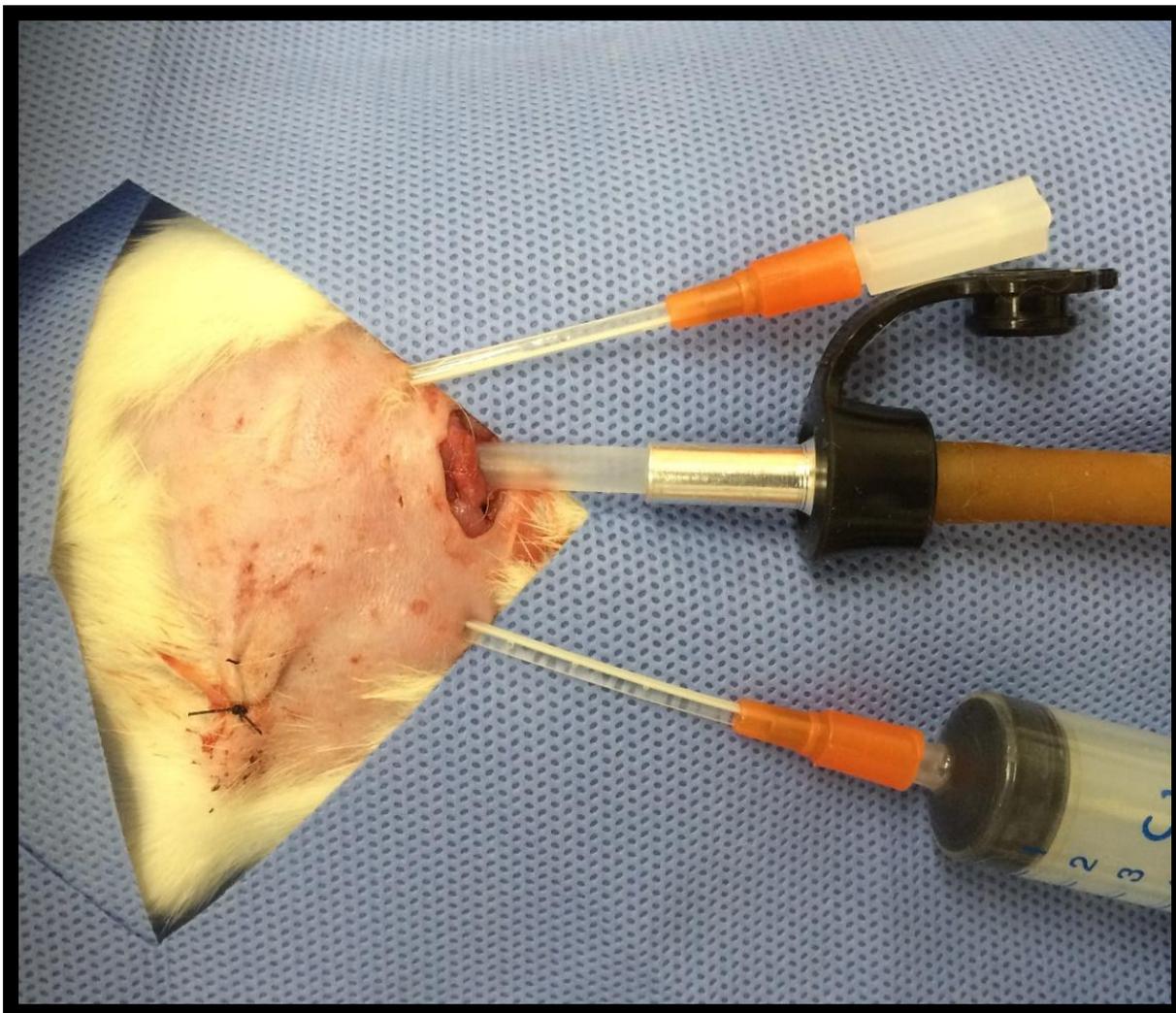
Fonte: Autoria própria.

4.4 Tratamento da peritonite

Duas horas após a indução da peritonite, os animais foram novamente anestesiados, posicionados e submetidos à antissepsia da região epilada, conforme descrito anteriormente. Desfez-se a sutura da parede abdominal e posicionou-se novamente no mesmo sítio, linha mediana a 3 cm do apêndice xifoide, um trocarte de 2 mm. Nos rebordos costais direito e esquerdo dois jelhos número 14 foram

posicionados (FIG. 2) e realizou-se sutura com fio categute cromado 4.0 no contorno do trocarte para impedir o escape de gás. Em seguida, confeccionou-se pneumoperitônio até 12 mmHg com gás correspondente ao grupo de estudo, por insuflador automático eletrônico já descrito. Utilizando-se videolaparoscópio convencional e ótica 0° e 2 mm, foi feito o inventário da cavidade com identificação da bolsa cecal seccionada. Em seguida, a cavidade abdominal foi lavada irrigando-se duas vezes com 5 mL de solução salina a 0,9% aquecida a 37°C, no total de 10 mL, por meio de seringa de 10 mL conectada ao jelco. Utilizando-se o mesmo dispositivo conectado a uma seringa de 20 mL, foi feita a aspiração de todo o líquido livre na cavidade. Passados 15 minutos, o pneumoperitônio foi desfeito, retirados o trocarte e os jelcos e, então, procedeu-se ao fechamento da parede abdominal em plano único com categute cromado 4-0.

FIGURA 2 – Posicionamento do trocante e dispositivos plásticos para tratamento da peritonite em rato *Wistar*



Fonte: Autoria Própria

4.5 Coleta de amostras

Depois de 24 horas da realização das cirurgias, os animais foram novamente anestesiados para coleta das amostras de tecido para histologia e sangue da veia cava inferior para quantificação de citocinas e cortisol. Em seguida, procedeu-se à eutanásia dos animais por meio de superdosagem de quetamina (Cristália Prod Quim Farmac Ltda. Itapira SP) na dose de 120 mg/kg. Feita nova laparotomia, foram identificadas e classificadas as alterações macroscópicas no coto da bolsa cecal. As alterações macroscópicas pesquisadas foram o número e o grau das aderências (frouxas – I; firmes - II; e muito firmes – III, QUAD. 1).

Foram também avaliados os órgãos envolvidos, a existência de abscessos pericecal, se havia ou não peritonite generalizada ou localizada, e em quantos quadrantes, e fístulas tamponadas e por quais órgãos⁵².

QUADRO 1 – Classificação das aderências entre a ligadura e o peritônio ou outras vísceras

Classificação	Características
Grau I - Frouxa	Desprendendo facilmente à manipulação.
Grau II - Firmes	Desprendendo facilmente à tração das estruturas.
Grau III - Muito firmes	Não desprendendo facilmente à tração das estruturas.

Fonte: Bicalho (2013)⁵².

4.6 Histologia

Fragmentos de peritônio parietal foram colhidos na linha média na região superior e inferior do abdome que em seguida foram fixados em formol a 10% e, após 24 horas, incluídos em blocos de parafina. A partir desses foram obtidos cortes histológicos corados pela hematoxilina-eosina. No material fez-se o exame histopatológico com vistas a determinar a angiogênese (ausente, leve, moderada ou acentuada) e o grau de inflamação a partir da quantificação do edema e descamação das células mesoteliais (ausente, leve, moderada ou acentuada), a presença e a concentração de exsudato de fibrina sobre o epitélio do peritônio parietal (ausente, leve, moderada ou acentuada), a formação de microabscessos e a relação entre o número de macrófagos e o número de fibroblastos por campo de maior aumento

4.7 Dosagem do cortisol, IL-1, IL-6, TNF α e leucometria

Foi coletado volume total de 4 mL de sangue venoso da veia cava inferior, que foi distribuído em dois tubos de eppendorff com 2 mL cada, sendo em um deles adicionado ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e no outro não foi adicionado anticoagulante.

No dia do experimento, a amostra de sangue tratada com EDTA foi utilizada para contagem e classificação eletrônica de células no sistema Sysmex SE 9500 e Cell Dyn 4000. O valor referente a leucócitos bastonetes de cada animal foi anotado para análise.

A outra amostra, sem anticoagulante, foi centrifugada por 10 minutos, separando-se o soro da porção celular. Esse procedimento foi repetido duas vezes. Em seguida, o soro foi congelado a -80°C e descongelado somente no dia do processamento. No dia da análise, o soro foi descongelado à temperatura ambiente e adicionou-se à placa de 96 poços 50 μl do soro a 50 μl de solução tampão e 18 μl do reagente de detecção dos *kits* (cortisol FPIA ELISA Kit; RLB00 - Rat IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine ELISA Kit; LEGEND MAX™ Rat TNF α ELISA Kit; LEGEND MAX™ Rat IL-6 ELISA *kit*). Esse material foi incubado à temperatura ambiente por duas horas. A seguir, lavou-se a placa com 500 μL da solução tampão e centrifugou-se a 2.500 rotações por minuto (rpm), temperatura ambiente, por 10 minutos. O sobrenadante foi então aspirado e adicionado a 200 μL de solução tampão. A solução foi levada ao fotoespectômetro e anotados os valores relativos aos níveis das citocinas segundo o programa computadorizado fornecido pelo fabricante.

4.8 Estatística

Os resultados da macroscopia e da histologia foram comparados entre os grupos pelo teste do qui-quadrado, com correção de Yates, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$. Os níveis de cortisol, citocinas e contagem de leucócitos bastonetes foram submetidos ao teste de normalidade, e aqueles com distribuição normal comparados entre os grupos por meio do teste de análise de variância (ANOVA). Valores que apresentaram diferença significativa foram comparados dois a dois pelo teste t de Student e consideradas diferenças no nível de $p < 0,05$. Variáveis com distribuição não normal foram comparadas pelo teste de Kruskal-Wallis, sendo considerados significativos valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Serão apresentado abaixo os resultados obtidos na referida pesquisa

5.1. Microscopia

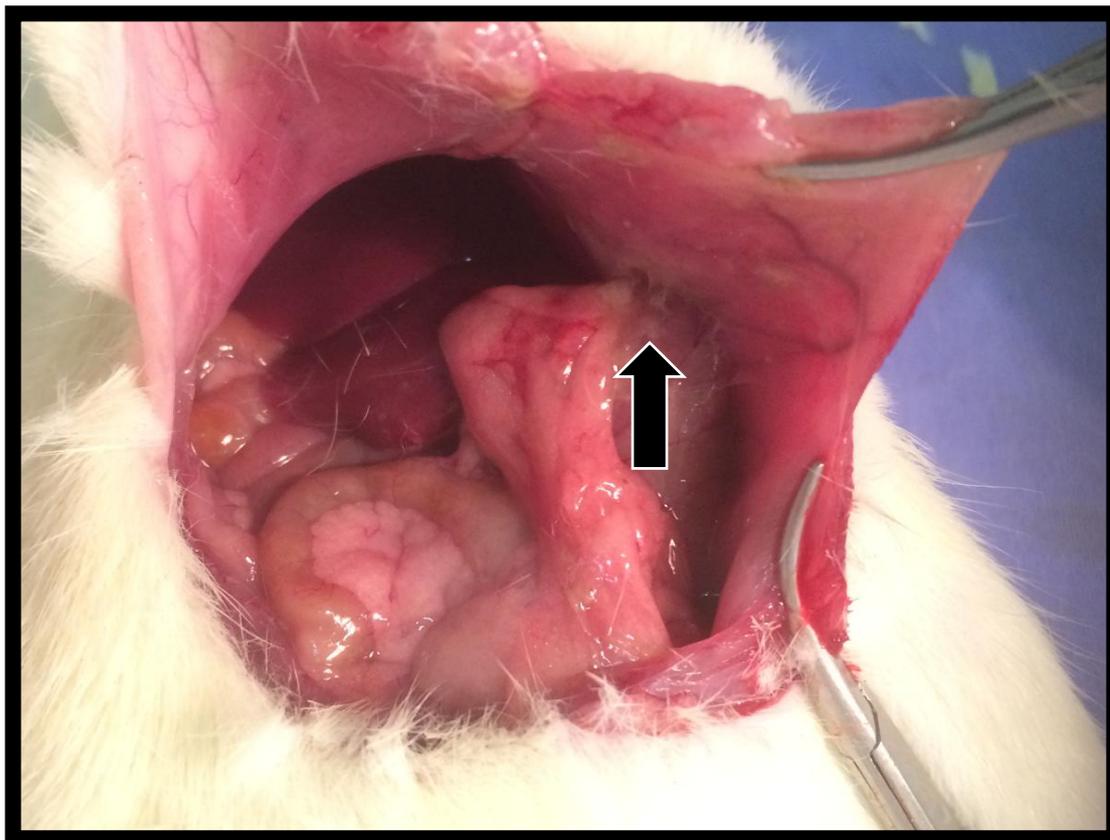
Nenhum animal apresentou sinal macroscópico de peritonite residual, abscesso intracavitário, fístulas ou dilatação de alças. Porém, aderências foram observadas em sete animais do grupo PC (87,5%) e em seis do grupo PH (75,0%), mas nenhum animal do grupo CC ou/e CH teve aderência. No grupo PH, as aderências foram frouxas em 25%, firmes em 50,0% e muito firmes 12,5% dos animais. Já no grupo PH as aderências foram frouxas em 12,5%, firmes em 12,5% e muito firmes em 50,0% dos casos (TAB. 1). Os órgãos aderidos à ligadura foram no grupo PC: omento, parede abdominal e intestino delgado. No grupo PH as aderências ocorreram com: omento, parede abdominal (FIG. 3) e intestino delgado.

TABELA 1 – Número e intensidade das aderências observadas a partir da inspeção da cavidade peritoneal

Aderências		Grupo PC (n=8)	Grupo CC (n=8)	Grupo PH (n=8)	Grupo CH (n=8)	P
Número		7 (87,5%)	0	6 (75,0%)	0	
Intensidade	Grau I	2 (25%)	0	1 (12,5%)	0	0,091
	Grau II	4 (50%)	0	1 (12,5%)	0	
	Grau III	1 (12,5%)	0	4 (50%)	0	

Fonte: Autoria Própria

FIGURA 3 – Aderência entre a ligadura e a parede abdominal (seta preta)



Fonte: Autoria Própria

5.2 Microscopia do peritônio parietal

A verificação de edema e descamação de células mesoteliais mostraram ausência nos grupos PC e PC; no grupo PH um animal apresentou edema e descamação leve (12,5%); também em dois animais do grupo CH foi constatada essa mesma intensidade de edema e descamação (25,0%), mas sem diferença estatística entre os grupos ($p=0,270$). O exsudato de fibrina, estava ausente em cinco animais (62,5%) do grupo PC, leve em dois (25,0%) e moderado em um (12,5%); no grupo CC estava ausente em sete animais (87,5%) e leve em um (12,5%); no grupo PH foi ausente em quatro casos (50,0%) e leve também em quatro (50,0%); no grupo CH três animais exibiam achados leve considerando essa variável (37,5%) e em cinco animais (62,5%) estavam ausentes; o exsudato de fibrina sobre o epitélio teve distribuição semelhante entre os grupos ($p=0,477$). A angiogênese verificada no grupo PC apresentou intensidade leve em dois animais (25,0%), moderada em dois (25,0%) e acentuada em quatro (50,0%); no grupo CC, foi moderada em cinco casos (62,5%) e acentuada em três (37,5%); no grupo PH, foi

leve em um caso (12,5%), moderada em três (37,5%) e acentuada em quatro animais (50,0%); e no grupo HC foi leve em quatro animais (50,0%), moderada em um (12,5%) e acentuada em três (37,5%); não houve diferença entre os grupos ($p=0,383$). Microabscessos somente foram detectados nos grupos PH e CH, sendo dois casos (25,0%) em cada um dos grupos, porém sem diferença ($p=0,51$). A média da relação macrófago/fibroblasto foi no grupo PC $0,21 \pm 0,02$, no grupo CC $0,24 \pm 0,02$, no grupo PH $0,25 \pm 0,04$ e no grupo CH $0,33 \pm 0,09$, sem diferença entre os grupos (TAB. 2 – FIG. 4 - $p=0,629$).

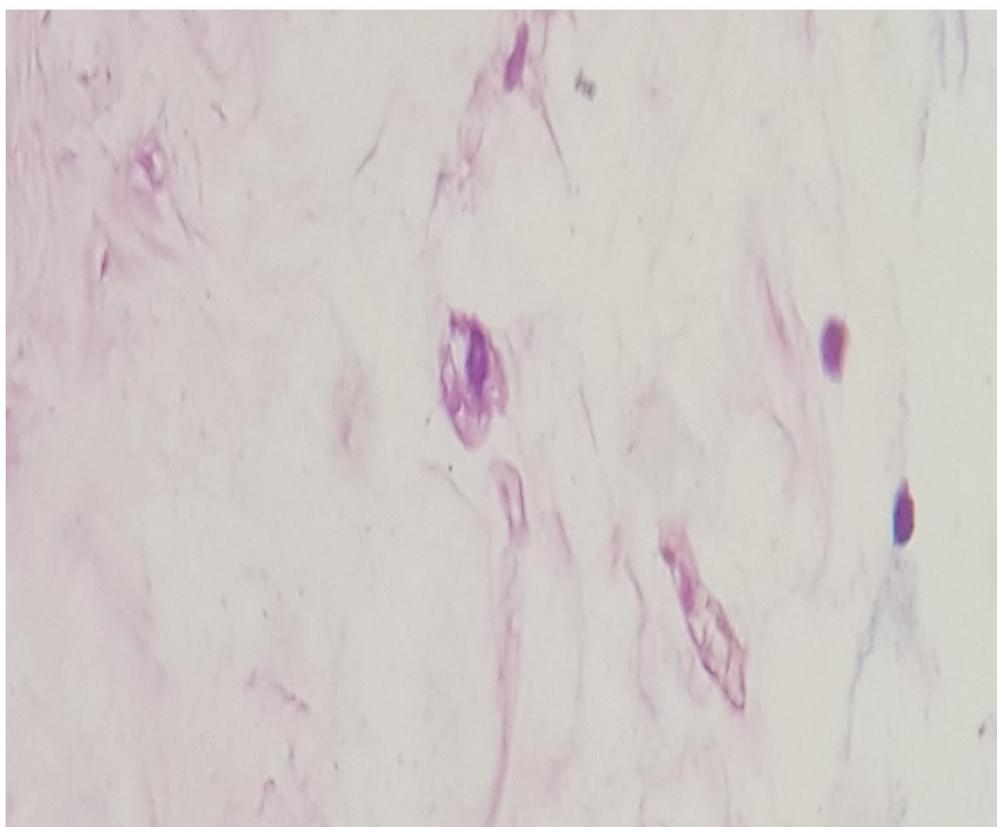
TABELA 2 – Apresentação dos achados histopatológicos do peritônio parietal

Variável		Grupo PC (n=8)	Grupo CC (n=8)	Grupo PH (n=8)	Grupo CH (n=8)	p
Edema e descamação das células mesoteliais	Ausente	8 (100%)	8 (100%)	7 (87,5%)	6 (75%)	0,270
	Leve	0	0	1 (12,5%)	2 (25%)	
	Moderado	0	0	0	0	
	Acentuado	0	0	0	0	
Exsudato fibrinoso	Ausente	5 (62,5%)	7 (87,5%)	4 (50%)	5 (62,5%)	0,477
	Leve	2 (25,5%)	1 (12,5%)	4 (50%)	3 (37,5%)	
	Moderado	1 (12,5%)	0	0	0	
	Acentuado	0	0	0	0	
Angiogênese	Ausente	0	0	0	0	

	Leve	2 (25,5%)	0	1 (12,5%)	4 (50%)	
	Moderada	2 (25,5%)	5 (62,5%)	3 (37,5%)	1 (12,5%)	0,383
	Acentuada	4 (50%)	3 (37,5%)	4 (50%)	3 (37,5%)	
Microabscessos	Ausente	8 (100%)	8 (100%)	6 (75%)	6 (75%)	0,51
	Presente	0	0	2 (25%)	2 (25%)	
Relação macrófago /fibroblasto		0,21 ± 0,02	0,24 ± 0,02	0,25 ± 0,04	0,33 ± 0,09	0,629

Fonte: Autoria Própria

FIGURA 4 – Histologia de peritônio parietal mostrando macrófago peritoneal. Grupo PC.



Fonte: Autoria Própria

5.3 Quantificação de cortisol, IL-1, IL-6 e TNF α

A mediana e os valores máximos e mínimos dos níveis sérico de cortisol são apresentados na TAB. 3.

TABELA 3 – Medianas, valores mínimos e máximos dos níveis séricos de cortisol

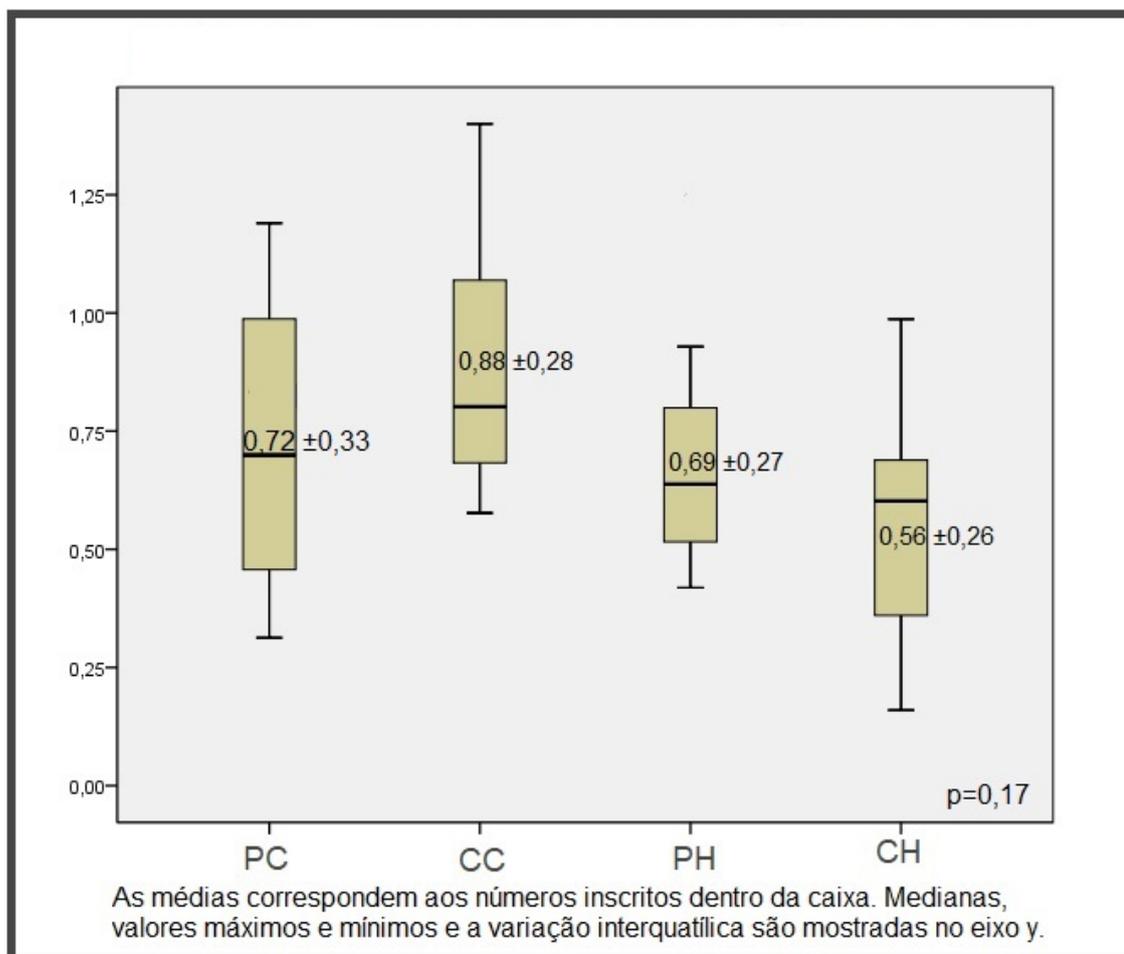
CORTISOL				
Grupo	PC	CC	PH	CH
Mediana	0,7	0,8	0,6	0,6
Min	0,31	0,58	0,42	0,16
Max	1,19	1,4	1,24	0,99

Fonte: Autoria Própria

Como pode ser observado no GRÁF. 1, as amostras analisadas revelaram que a média de cortisol, (expressa em ng/mL), foi de $0,72 \pm 0,33$ no grupo PC; 0,88

$\pm 0,28$ no grupo CC; $0,69 \pm 0,27$ no grupo PH; e $0,56 \pm 0,26$ no grupo CH, sem diferença entre os grupos ($p=0,17$).

GRÁFICO 1 – Comparação da variação verificada nos valores dos níveis de cortisol aferidos no sangue da veia cava gos grupos PC, CC, PH e CH



Fonte: Autoria Própria

A TAB. 4 apresenta os dados referentes às medianas, máximos e mínimo para os níveis de IL-1, IL-6 e TNF α para os grupos PC, CC, PH e CH

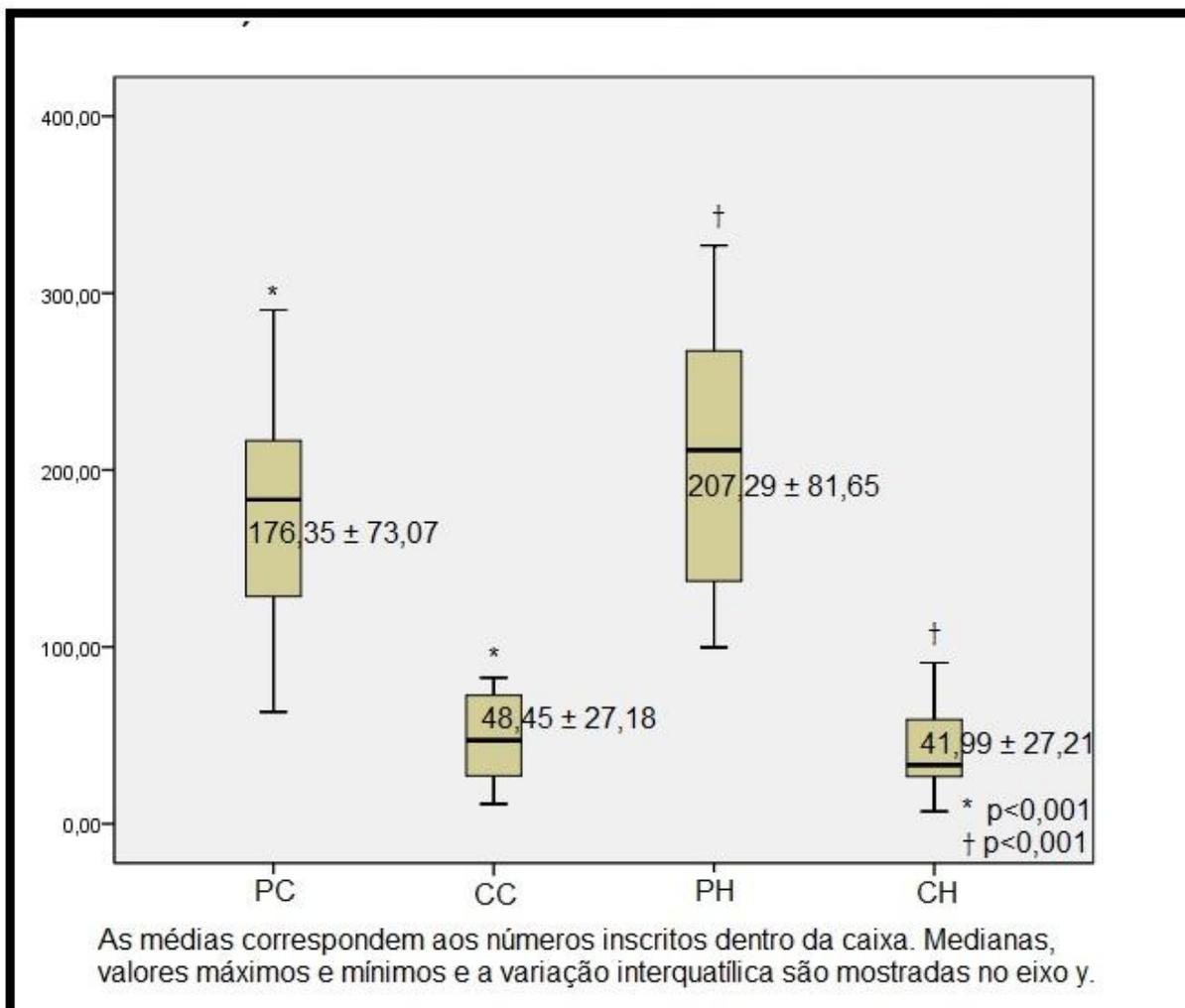
TABELA 4 – Medianas, valores mínimos e máximos dos níveis séricos das citocinas: IL-1, IL-6 e TNF α

Grupo	PC	CC	PH	CH
IL-1				
Mediana	183,32	47,17	211,305	33,24
Min	63,25	11,26	99,7	6,97
Max	290,53	82,55	326,98	91,12
IL-6				
Mediana	175,045	33,75	166,51	40,135
Min	72,15	17,5	41,59	14,09
Max	305,09	74,11	361,63	146,44
TNFα				
Mediana	12,35	30,52	92,03	36,01
Min	0	0	0	0
Max	48	168	103	83

Fonte: Autoria Própria

Analisando-se o GRÁF. 2 pode-se observar que a concentração de IL-1, expressa em pg/mL apresentou uma média de $176,35 \pm 73,07$ no grupo PC, $48,45 \pm 27,18$ no grupo CC, $207,29 \pm 81,65$ no grupo PH e $41,99 \pm 27,21$ no grupo CH.

GRÁFICO 2 – Comparação da variação verificada nos valores de IL-1 medidos no sangue da veia cava dos animais dos grupos PP, CC, PH e CH



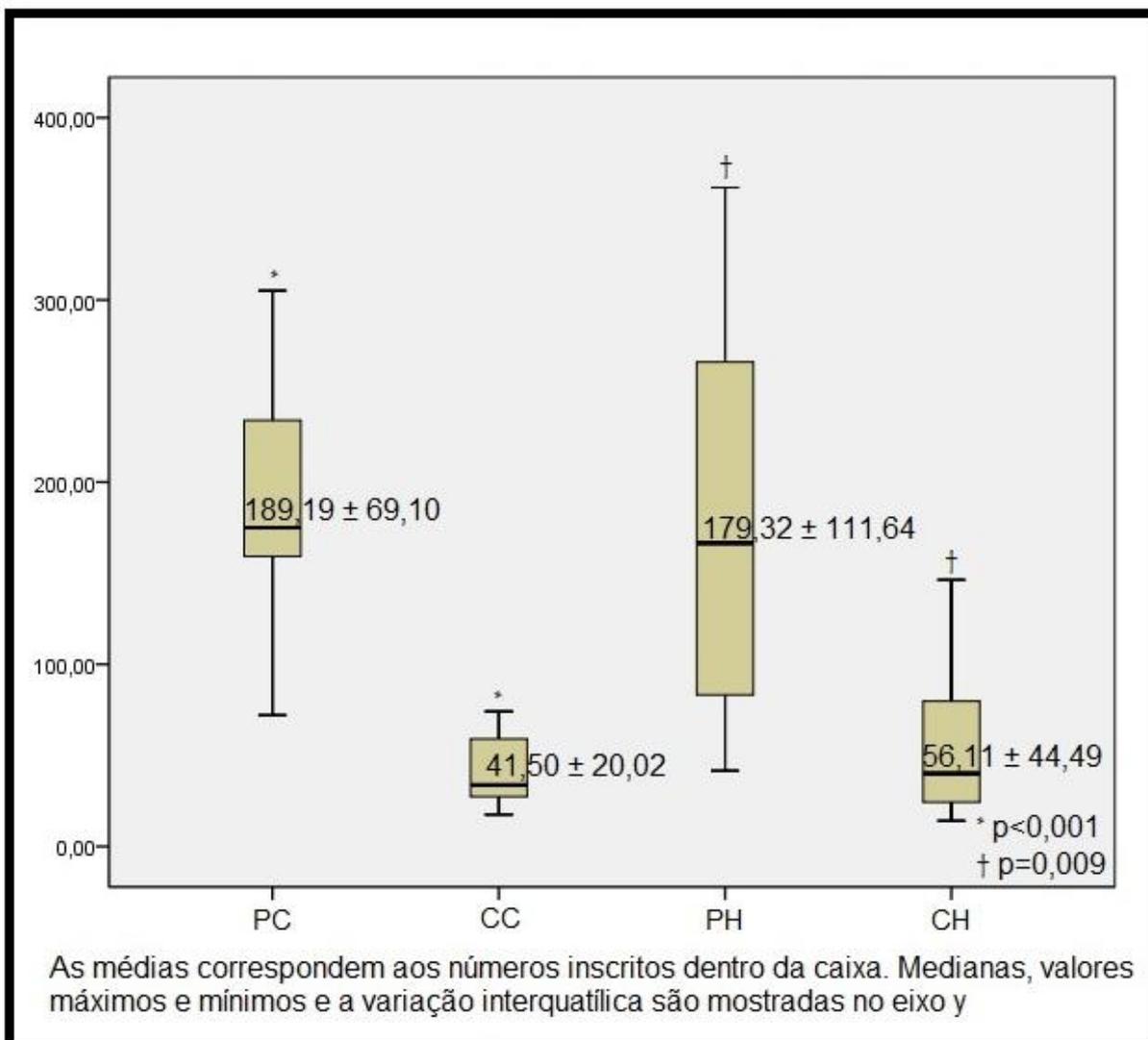
Fonte: Autoria Própria

A análise multivariada revelou diferença entre os grupos ($p < 0,001$). Comparando os grupos dois a dois, a concentração de IL-1 mostrou diferença entre os grupos PC e CC ($p < 0,001$) e PH e CH ($p < 0,001$).

Analisando-se o GRÁF. 3 pode-se concluir que a concentração da IL-6, expressa em pg/mL, apresentou uma média de $189,19 \pm 69,10$ no grupo PC, $41,50 \pm 20,02$ no grupo CC, $179,32 \pm 111,64$ no grupo PH e de $56,11 \pm 44,49$ no grupo CH.

A análise multivariada do referido gráfico leva-se a concluir que apresenta-se uma diferença nos valores de IL-6 entre os grupos ($p < 0,001$) e as comparações entre dois grupos mostraram diferenças entre os grupos PC e CC ($p < 0,001$) e os grupos PH e CH ($p = 0,009$). Não houve diferença significativa entre os grupos PC e PH ($p = 1,000$), CC e CH ($p = 1,000$).

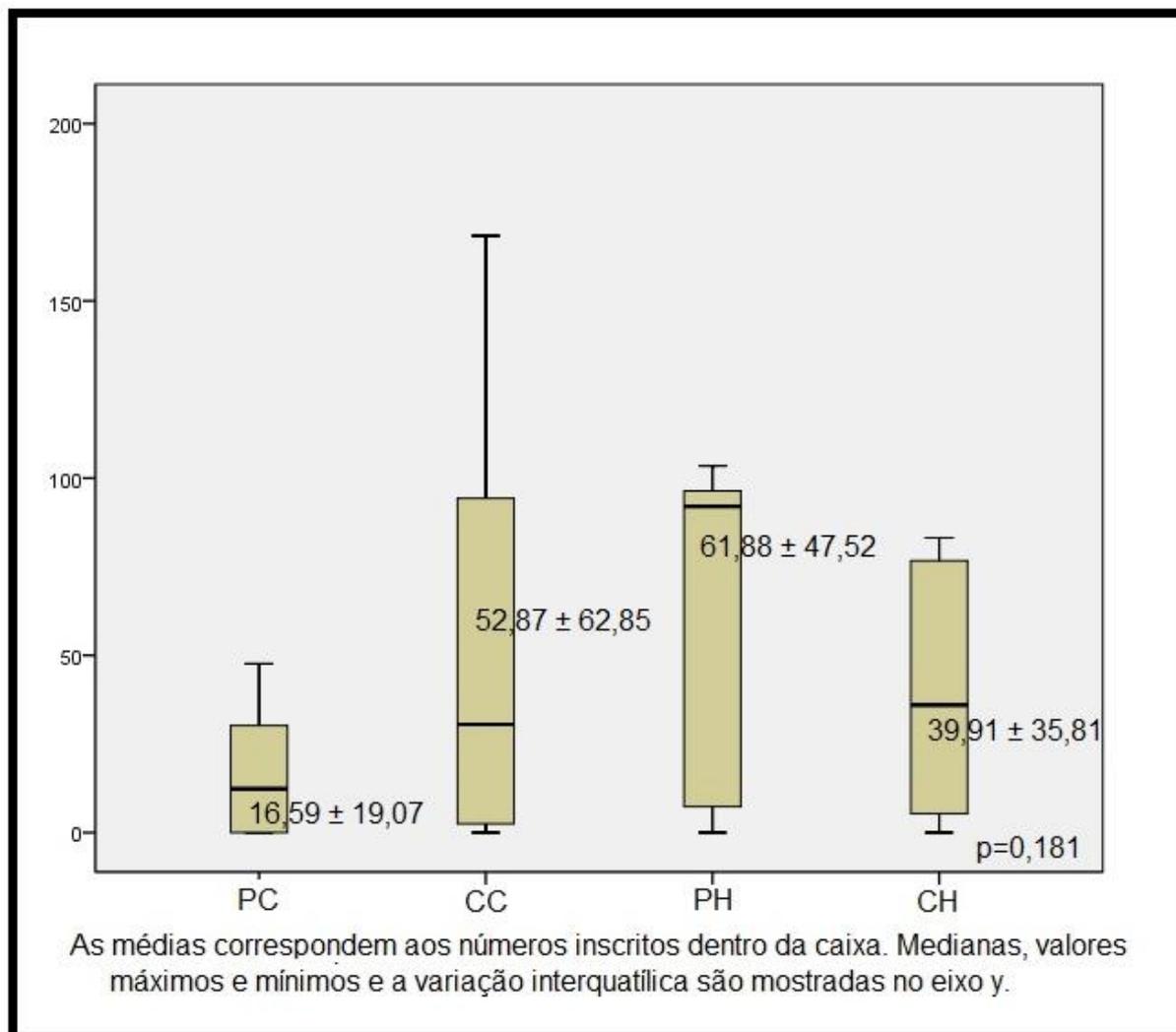
GRÁFICO 3 – Comparação da variação verificada nos valores de IL-6 aferidos no sangue da veia cava dos animais dos grupos PC, CC, PH e CH



Fonte: Autoria Própria

Quanto ao fator de necrose tumoral alfa, as médias de concentrações encontradas, expressas em ng/mL, foram de $16,59 \pm 19,07$ para o grupo PC, de $52,87 \pm 62,85$ para o grupo CC, $61,88 \pm 47,52$ para o grupo PH e de $39,91 \pm 35,81$ para o grupo CH. Não houve diferença significativa entre os grupos ($p=0,181$). Tais dados podem ser observados no GRÁF. 4

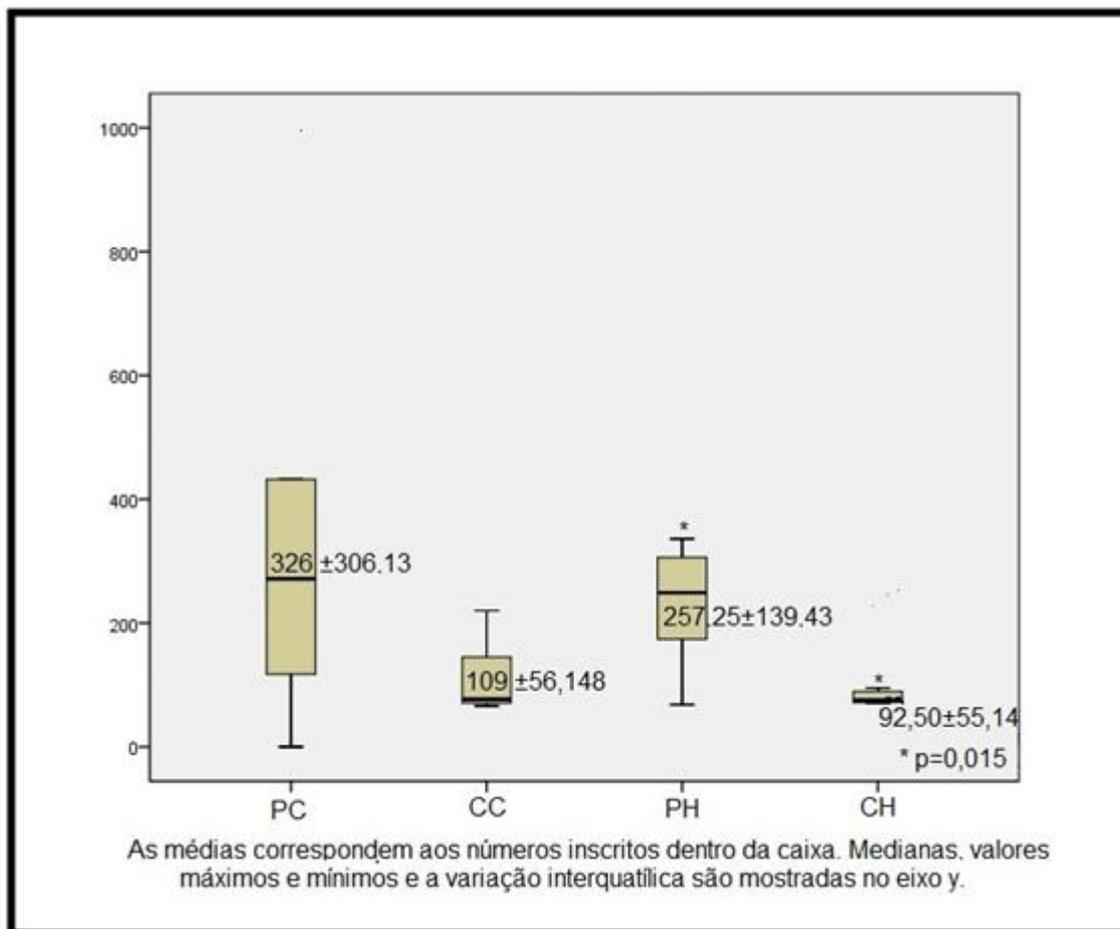
GRÁFICO 4 – Comparação da variação verificadas nos valores de TNF α aferidos no sangue da veia cava dos animais dos grupos PC, CC, PH e CH



Fonte: Autoria Própria

A contagem de células jovens, bastonetes, nas amostras, teve como resultado nos grupos PC, CC, PH e CH, respectivamente, $326 \pm 306,13$, $109 \pm 56,148$, $257,25 \pm 139,43$, $92,50 \pm 55,14$, com diferença entre os grupos ($p=0,018$). Comparando os grupos dois a dois, verificou-se que existia diferença somente entre os grupos PH e CH ($p=0,015$), sendo que o grupo PH mostrou maior contagem leucocitária do que o grupo-controle. Tais dados podem ser observados no GRÁF. 4

GRÁFICO 5 – Comparação da variação verificada nos valores de bastonetes aferidos no sangue da veia cava dos animais dos grupos PC, CC, PH e CH



Fonte: Autoria Própria

6 DISCUSSÃO

A peritonite é afecção que cursa com elevados índices de mortalidade, e o controle da fonte de infecção é a principal condição para o sucesso do tratamento^{5,53-55}. A utilização de **táticas** cirúrgicas menos invasivas, em particular a drenagem percutânea e a cirurgia laparoscópica, tem sido opção para os cirurgiões que em seu cotidiano são confrontados com infecções abdominais complexas em pacientes com características desfavoráveis e comorbidades como diabetes, obesidade, idade avançada e imunossupressão. Nesses casos, o impacto de uma laparotomia, apesar de primordial para controle da fonte de infecção, pode ser um preço alto a ser pago considerando condições fisiológicas limítrofes⁵⁵. A utilização cada vez maior de táticas de abordagem cirúrgica menos invasivas justifica a realização de estudos que investiguem a influência da via de acesso para tratamento da sepse abdominal na resposta do organismo à agressão cirúrgica, principalmente nos mecanismos imunológicos, o que pode influenciar a tomada de decisão entre uma conduta mais ou menos invasiva ou uma via de acesso mais ou menos traumática, considerando-se as particularidades de cada caso e riscos e benefícios dos procedimentos propostos.

A necessidade de investigar aspectos da sepse abdominais relacionados à resposta local e sistêmica incita à busca de modelos de experimentação animal que reproduzam o comportamento do sistema imunológico na vigência de sepse de origem abdominal. Modelos experimentais têm sido empregados para indução de peritonite, tais como deposição intraperitoneal de fezes com ou sem adjuvantes; inoculação de microrganismos com cepas e quantidade definidas com ou sem adjuvantes ou por meio da confecção de uma fonte endógena de contaminação fecal, promovendo-se uma solução de continuidade no intestino do animal. Neste último, são bem estabelecidas a ligadura a punção do ceco (LPC) e a aplicação de prótese tubular no cólon ascendente⁵⁶.

O modelo que melhor representa uma cirurgia com peritonite polimicrobiana é a LPC^{11,57} que foi descrito por de Wichterman (1980) e resulta em choque séptico e morte do animal em 24 a 48 horas após a indução da peritonite, na ausência de tratamento⁵⁸. Observa-se que animais submetidos à LPC apresentam infecção polimicrobiana associada a bacteremia, septicemia e alterações hemodinâmicas caracterizadas por uma fase hiperdinâmica precoce e hipodinâmica tardia, semelhante àquelas observadas na prática clínica. Todavia, a quantificação precisa do agravo continua representando um desafio para utilização do modelo proposto

por Wichterman (1980), justificado pela dificuldade em se reproduzir o procedimento em alto número de animais⁵⁹. Além disso, como foi originalmente descrito, a LPC não prevê reposição volêmica nem o emprego de antimicrobianos, o que aumenta a mortalidade e promove a falta de correlação entre o modelo e a realidade clínica. No presente estudo animais foram tratados com antimicrobianos, essa modificação no método foi sugerida por revisores de outros trabalhos do grupo e acatada considerando a relevância ética da sugestão.

A utilização da LPC permite prever com relativa segurança o índice de mortalidade e o tempo de sobrevivência dos animais calibrando o volume de fezes liberado na cavidade peritoneal dos animais pelo calibre da agulha usada para punção e pelo número de punções produzidas no ceco dos indivíduos⁶⁰. O emprego de um molde plástico de 3 mm de diâmetro como modificação do método para realização da LPC, buscando uniformização tamanho da “bolsa cecal” no modelo, foi sugerido por Salgado Jr.⁶¹. O uso de dispositivo de ligadura elástica LPC foi descrito pelos autores do presente estudo⁵¹, com o intuito de também de padronizar o tamanho da bolsa cecal, homogeneizando o volume de tecido intestinal apreendido em cada ligadura, facilitando o procedimento e reduzindo as discrepâncias relatadas por Mathiak⁵⁹, equiparando o dano sofrido por todos os animais dos grupos submetidos ao procedimento e permitindo sua reprodução confiável.

A escolha do modelo experimental é muito importante para o sucesso e aplicabilidade clínica do estudo proposto, interferindo diretamente na avaliação da variável em estudo e, portanto, nos resultados obtidos. O modelo ideal de indução de peritonite deve ser simples, tecnicamente fácil de aprender e executar, reprodutível em grande número de animais e deve proporcionar resultados confiáveis, ou seja, índices de mortalidades previsíveis e consistentes, além de ter boa padronização, ser econômico e dentro das normas estabelecidas pelos órgãos de fiscalização. Infelizmente, não existe um modelo com todas essas características, e entre os mais estudados a LPC tem sido eleita como método padrão por vários pesquisadores para avaliar a resposta imunológica em situações de sepse de origem abdominal^{11,57}.

Pequenos animais são os mais frequentemente utilizados, pois as características das espécies proporcionam custo relativamente baixo de aquisição, acomodação e manutenção⁶². Além disso, pode-se dispor de representativo número de indivíduos geneticamente semelhantes com certa facilidade, rapidez e a custo

acessível. Outra vantagem é a existência, em escala comercial, de reagentes para análises bioquímicas, laboratórios com boa padronização da citometria e morfometria, sondas biológicas para detecção de estruturas celulares e moleculares, bem como número crescente de animais com modificações genéticas específicas permitindo o estudo de situações clínicas particulares^{63,64}. Por outro lado, pequenos roedores são relativamente resistentes a endotoxinas, possuem perfil hemodinâmico diferente da espécie humana e volume circulante pequeno, o que prejudica análises séricas repetidas e aferição de parâmetros hemodinâmicos de interesse.

A reduzida dimensão dos animais também limita algumas terapias, que são rotineiramente utilizadas na unidade de cuidados intensivos em seres humanos em estado crítico, por exemplo, aqueles com sepse de origem abdominal. O tamanho dos animais também dificulta algumas aferições importantes para avaliação da evolução clínica⁶⁵ e também poderia interferir nos resultados, ocultando discretas alterações relacionadas à variável estudada, tendo em vista que procedimentos utilizados como controle também iriam promover uma resposta endócrino-metabólica ao trauma e, conseqüentemente, alterações inflamatórias e imunológicas cujas diferenças sejam indetectáveis pela metodologia aplicada, embora de fato existam. Essa pode ser uma das justificativas para ausência de diferença nos valores de cortisol encontrada entre os grupos neste trabalho.

Foram utilizados ratos *Wistar* nesse trabalho a sepse foi induzida por um método semelhante a LPC por via laparoscópica com um dispositivo de ligadura elástica. Nenhum dos animais estudados desenvolveu sinais macroscópicos de peritonite, contrariando as observações de Hanly⁶⁶, que dão conta da ocorrência de líquido peritoneal turvo, compatível com peritonite, 24 horas depois dos animais serem submetidos à LPC também por via laparoscópica⁶⁶. Há que se considerar que a metodologia proposta por Hanly⁶⁶ não previa o tratamento local da peritonite com irrigação de SF 0,9%, como realizado pelos autores nesse modelo à semelhança do que se realiza na prática clínica.

A sepse é uma síndrome clínica potencialmente fatal induzida por infecção e caracterizada por uma reação inflamatória disfuncional, que se inicia pela produção de um conjunto de citocinas pró-inflamatórias a partir de células de reconhecimento, conhecida como resposta imunológica inata, que irá se estender por alguns dias, e a qual a maioria dos pacientes sobrevive. A essa fase inicial segue-se um período de imunossupressão, considerada a principal responsável pela morbidade e

mortalidade associadas à sepse⁶⁷. A gravidade do quadro clínico da síndrome depende, em parte, da agressividade dos patógenos envolvidos e também, talvez principalmente, da disfunção imunológica desenvolvida pelo hospedeiro e caracterizada pela imunossupressão que se segue à produção inicial das citocinas pró-inflamatórias que Deng chamou de “*tempestade de citocinas*” (“*cytokine storm*”)¹¹. Em seu estudo Deng conclui que um dia após a indução de peritonite em ratos ocorre o “ponto de viragem” (*turning point*) da fase pró-inflamatória para imunossupressão¹¹. Portanto, é o momento ideal para se estudar o pico da citocinas pró-inflamatórias, como se realizou no presente estudo. Concebeu-se então essa experimentação para compreender melhor como os gases utilizados para confecção do pneumoperitônio irão interferir na resposta imunológica de indivíduos sépticos tratados por laparoscopia no pico da fase pró-inflamatória, quando as citocinas características dessa fase estarão no momento de sua maior produção. O modelo utilizado para esse fim verificou os níveis séricos das citocinas pró-inflamatórias produzidas um dia após a indução da peritonite, portanto, exatamente no momento proposto por Deng¹¹ como sendo o do “ponto de viragem”.

Alterações fisiopatológicas verificadas em modelos experimentais, que ocorrem durante a evolução dessa síndrome, são caracterizadas por elevação dos níveis séricos de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF α , redução de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e a ativação de várias vias de sinalização intracelulares nos leucócitos, com expressão aumentada de genes transcritores específicos e cujo gatilho de deflagração ainda é incompreendido^{49,68}. Assim, tem-se nos modelos animais de sepse uma fase inicial em que há aumento da produção das citocinas pró-inflamatórias, seguida de disfunção imunológica tardia, muito semelhante ao que acontece na sepse clínica^{11,69}. A produção aumentada de IL-6 é considerada fator independente de mau prognóstico na sepse clínica e, da mesma forma, altos níveis de IL-6 estão estreitamente relacionados ao aumento da mortalidade em ratos submetidos à LPC. Portanto, no modelo utilizado os níveis de IL-6 indicam a gravidade da doença em cada grupo⁷⁰.

O CO₂ é o gás mais utilizado para a insuflação da cavidade abdominal durante o procedimento de laparoscopia²³. Alguns autores têm demonstrado que a insuflação da cavidade peritoneal com esse gás contribui para a atenuação da resposta imunológica discutida anteriormente³⁰⁻³³. *In vitro* e *in vivo*, a produção de TNF α e IL-1 foi menor no grupo exposto a CO₂ em comparação ao Hélio³⁰. Também

foi observado em estudo *in vitro* que a redução do pH intra e extracelular e a produção menor de citocinas no grupo tratado com CO₂ foi atribuída à acidificação do meio. Verificou-se, concomitantemente, que uma redução farmacológica do pH intracelular também é acompanhada de um efeito inibitório na produção de moléculas pró-inflamatórias de maneira semelhante ao que foi observado *in vivo*. A partir desses referenciais, adotou-se como pressuposto que a acidificação induzida pelo pneumoperitônio com CO₂ contribui para a atenuação da resposta inflamatória durante a cirurgia laparoscópica, independentemente de sua origem. Então, o presente estudo comparou parâmetros inflamatórios e imunológicos de animais que utilizaram CO₂ ou Hélio na confecção do pneumoperitônio para tratamento laparoscópico da sepse de origem abdominal, com irrigação de soro fisiológico a 0,9%.

Eleftheriadis (1996)²⁸ utilizando modelo animal empregou CO₂ para confecção do pneumoperitônio à pressão de 15 mmHg por 60 minutos e concluiu que a pressão intra-abdominal elevada causa isquemia intestinal, libera radicais livres do oxigênio e facilita a translocação bacteriana. Essas condições estão associadas à hipercarbia e à acidose que, pelo menos em tese, são responsáveis pelo aumento do número e da resistência de aderências peritoneais. Portanto, espera-se mais formação de aderências em indivíduos submetidos à laparoscopia utilizando o CO₂ para confecção do pneumoperitônio quando comparados a um grupo em que se realiza o mesmo procedimento utilizando um gás inerte como, por exemplo, o Hélio, admitindo-se que a acidificação do peritônio ocorra em função do tipo de gás⁴⁷.

No presente estudo, o número e a resistência das aderências foram maiores nos grupos com peritonite em relação aos controles, porém sem diferença em relação ao tipo de gás utilizado. Esses resultados corroboram os encontrados por Rosch, que não encontrou diferença entre o CO₂ e o Hélio quando comparado à incorporação de biomateriais e à formação de aderências⁷¹. Ainda assim, a formação de aderências pode estar relacionada à acidificação e à isquemia peritoneal, porém essa queda no pH poderia estar relacionada ao aumento da pressão intra-abdominal como consequência da redução da perfusão e drenagem renal e não seria diferente quando comparado o CO₂ e o Hélio⁴⁶. Por outro lado, a literatura registra menos aderências no grupo tratado com Hélio em comparação ao CO₂ em caso de peritonite. E apesar desse modelo ser mais parecido com o do presente estudo, os resultados são conflitantes⁷². Essa variação pode ser atribuída à

diferença na pressão do gás utilizado, que no trabalho de Jacobi⁷² foi de 8 mmHg e a que se utilizou nesta pesquisa foi de 12 mmHg. Em seu estudo, Rosch⁷¹ atribuiu a formação de aderências à hipoxemia superficial das estruturas e argumentou que elas poderiam ser prevenidas com o enriquecimento do meio com oxigênio - mais um dado que corrobora as afirmações de Shuto⁴⁶. A análise histológica das amostras de peritônio obtidas nesse estudo não mostrou diferença entre os grupos nas variáveis verificadas, não se podendo inferir a partir dos dados ora divulgados a ocorrência ou não de isquemia relacionada ao tipo de gás utilizado na confecção do pneumoperitônio porque a pressão foi constante nos quatro grupos estudados e não foi objeto desta experimentação.

Os resultados dessa experimentação relativos à resposta inflamatória e sua mediação imunológica revelam diferença na concentração sérica dos mediadores imunológicos da inflamação entre os animais com e sem infecção. Mas não foi constatada diferença no comportamento dessa resposta em relação ao tipo de gás utilizado. Os valores aferidos para as citocinas pró-inflamatórias IL-1 e IL-6 foram corroborados pelo aumento das células jovens no sangue periférico. Já o TNF α não apresentou diferença entre os grupos, o mesmo resultado que Clary encontrou avaliando o efeito dos mesmos gases em porcos submetidos à peritonite pela inoculação de 20 mg/kg de fezes frescas em 5 mL de solução salina²⁶.

Sietses, analisando a resposta inflamatória e a produção de citocinas pró-inflamatórias em 33 pacientes sem comorbidades que seriam submetidos à colecistectomia laparoscópica, ressaltou que o pneumoperitônio com CO₂ é capaz de atenuar a resposta inflamatória pós-operatória, preservando a capacidade de reação imunológica dos pacientes e, portanto, conservando a capacidade de esses pacientes reagirem contra a infecção ou, no caso de cirurgias oncológicas, contra o crescimento tumoral⁴⁸. No entanto, em estudos experimentais, essa capacidade tem sido posta à prova e o CO₂ tem sido responsabilizado pelo declínio da capacidade de macrófagos reagirem a agressões infecciosas²⁹. Por outro lado, o pneumoperitônio confeccionado com CO₂ reduziu a mortalidade em animais com peritonite bacteriana induzida³⁴⁻³⁶, o que, em tese, confere ao CO₂ papel protetor da função imunitária em indivíduos submetidos a procedimentos por via laparoscópica utilizando esse gás na confecção do pneumoperitônio.

A partir dos dados obtidos nessa experimentação, não foi possível comprovar a proteção imunológica encontrada³⁴⁻³⁶, uma vez que inexistiu diferença entre os

gases estudados quando se comparou a produção das citocinas IL-1 e IL-6. Considerando que esses resultados foram encontrados em condições específicas em animais de pequeno porte sugere-se que novos estudos sejam planejados para que se conheça em outras situações experimentalmente planejadas, utilizando espécies diferentes de ratos *wistar* por exemplo para comprovar a inexistência do papel protetor do CO₂ em relação a outros gases alternativos. Portanto, diante dos dados verificados nessa experimentação não há vantagem na utilização de um desses gases sobre o outro relacionada à preservação da resposta imunitária em modelo de sepse abdominal, não se justificando o emprego sistemático do Hélio em pacientes com peritonite.

7 CONCLUSÃO

A intensidade da inflamação local e sistêmica em ratos submetidos à LPC modificada tratados por via laparoscópica com insuflação de CO₂ ou Hélio não mostrou diferença significativa.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Holzheimer RG. Management of secondary peritonitis. In: Holzheimer RG, Mannick JA, editors. *Surgical Treatment: Evidence-Based and Problem-Oriented*. Munich: Zuckschwerdt; 2001. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6950/>
2. Hau T. Biology and treatment of peritonitis: the historic development of current concepts. *J Am Coll Surg*. 1998; 186(4):475-484.
3. Maddaus MA. The biology of peritonitis and implications for treatment. *Surg Clin North Am*. 1988; 68(2):431-443.
4. Cirocchi R. A historical review of surgery for peritonitis secondary to acute colonic diverticulitis: from Lockhart-Mummery to evidence-based medicine. *World J Emerg Surg*. 2017; Available from: <https://doi.org/10.1186/s13017-017-0120-y>.
5. Cirocchi R. Laparoscopic lavage versus surgical resection for acute diverticulitis with generalised peritonitis: a systematic review and meta-analysis. *Techn Coloproctol*. 2017; 21(2):93-110.
6. Brokelman WJ. Peritoneal changes due to laparoscopic surgery. *Surg Endosc*. 2011 Jan;25(1):1-9.
7. Bhan C. Role of cellular events in the pathophysiology of sepsis. *Inflamm Res*. 2016; 65(11):853-868.
8. Oghiso Y. Exudation of proliferative macrophages in local inflammation in the peritoneum. *J Leukoc Biol*. 1992; 52(4):421-424.
9. Van Till JW. The innate immune response to secondary peritonitis. *Shock*. 2007; 28(5):504-517.
10. Davies MG. Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg*. 1997; 84(7):920-935.
11. Deng D. Systematic investigation on the turning point of over-inflammation to immunosuppression in CLP mice model and their characteristics. *Int Immunopharmacol*. 2017; 42(1):49-58.
12. Biffl WL. Interleukin-6 in the injured patient: marker of injury or mediator of inflammation? *Ann Surg*. 1996; 224(5):647-664.
13. Novitsky YW. The net immunologic advantage of laparoscopic surgery. *Surg Endosc*. 2004; 18(10):1411-1419.
14. Nagy AG. History and development of laparoscopic surgery. In: Eubanks SL. *Mastery of endoscopic and laparoscopic surgery*. Philadelphia PA USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2000; 007-11.

15. Sauerland S. Laparoscopic versus open surgery for suspected appendicitis. *Cochrane Database Syst Rev.* 2010. Available from: 10:CD001546. doi:10.1002/14651858.CD001546.pub3.
16. Rosch R. Impact of pressure and gas type on anastomotic wound healing in rats. *Langenbecks Arch Surg.* 2004; 389(4):261-266.
17. Sido B. Inflammatory response after abdominal surgery. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2004; 18(3):439-54.
18. Hart PH. Peritoneal macrophages during peritonitis: Phenotypic studies. *Clin Exp Immunol.* 1992; 88(3):484-491.
19. Fieren MW. Peritoneal macrophages from patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis show a differential secretion of prostanoids and interleukin-1 beta. *Prostagl Leukot Ess Fatty Acids.* 1992; 47(1):23-28.
20. Zemel D. Analysis of inflammatory mediators and peritoneal permeability to macromolecules shortly before the onset of overt peritonitis in patients treated with CAPD. *Perit Dial Int.* 1995; 15(2):134-141.
21. Robertson CM. The systemic inflammatory response syndrome. *Microbes Infect.* 2006; 8(5):1382-1389.
22. Teale DM. Inhibition of nitric oxide synthesis improves survival in a murine peritonitis model of sepsis that is not cured by antibiotics alone. *J Antimicrob Chemother.* 1992; 30(6):839-842.
23. Cheng Y. Gases for establishing pneumoperitoneum during laparoscopic abdominal surgery. 2013. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD009569.pub2/abstrac>.
24. Austin WE. Solubility of carbon dioxide in serum from 14 to 38°C. *J Appl Physiol.* 1963; 18(3):301-304.
25. Weathersby PK. Solubility of inert gases in biological fluids and tissues: A review. *Undresea Biomed Res.* 1990; 7(4):277-296.
26. Clary EM. Effects of pneumoperitoneum on hemodynamic and systemic immunologic responses to peritonitis in pigs. *J Surg Res.* 2002; 32(1):32-38.
27. Neuhaus SJ. Helium and other alternative insufflation gases for laparoscopy. *Surg Endosc.* 2001; 15(6):553-560.
28. Eleftheriadis E. Gut ischemia, oxidative stress, and bacterial translocation in elevated abdominal pressure in rats. *World J Surg.* 1996; 20(1):11-16.
29. Chekan EG. Intraperitoneal immunity and pneumoperitoneum. *Surg Endosc.* 1999; 13(11):1135-1138.

30. West MA. Kinetics of decreased LPS-stimulated cytokine release by macrophages exposed to CO₂. *J Surg Res.* 1996; 63(1):269-74.
31. Shimotakahara A. Carbon dioxide directly suppresses spontaneous migration, chemotaxis, and free radical production of human neutrophils. *Surg Endosc.* 2008; 22(8):1813-1817.
32. Neuhaus SJ. Pneumoperitoneum and peritoneal surface changes: a review. *Surg Endosc.* 2004.18(9):1316-1322
33. Matsumoto T. The effect of gases in the intraperitoneal space on cytokine response and bacterial translocation in a rat model. *Surg Endosc.* 2001; 15(1):80-84.
34. Hanly EJ. Carbon dioxide pneumoperitoneum prevents mortality from sepsis. *Surg Endosc.* 2006; 20(9):1482-1487.
35. Sorbello AA. Protective effect of carbon dioxide against bacterial peritonitis induced in rats. *Surg Endosc.* 2010; 24(8):1849-1853.
36. Metzelder M. CO₂ Pneumoperitoneum Increases Survival in Mice with Polymicrobial Peritonitis. *Eur J Pediatr Surg.* 2008; 18(3):171-75.
37. Ost MC. Pneumoperitoneum with carbon dioxide inhibits macrophage tumor necrosis factor-alpha secretion: source of transitional-cell carcinoma port-site metastasis, with prophylactic irrigation strategies to decrease laparoscopic oncologic risks. *J Endourol.* 2008; 22(1):105-112.
38. Jacobi CA. Impact of laparoscopy with carbon dioxide versus helium on local and systemic inflammation in an animal model of peritonitis. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A.* 1996; 9(3):305-312.
39. Strobel O. Effect of a pneumoperitoneum on systemic cytokine levels, bacterial translocation, and organ complications in a rat model of severe acute pancreatitis with infected necrosis. *Surg Endosc.* 2006; 20(12):1897-1902.
40. Machado MCC. CO₂ Abdominal Insufflation Decreases Local and Systemic Inflammatory Response in Experimental Acute Pancreatitis. *Pancreas,* 2010; 39(2):175-181.
41. McMahon AJ. Helium pneumoperitoneum for laparoscopic cholecystectomy: ventilatory and blood gas changes. *Br J Surg.* 1994; 81(7):1033-1036.
42. Richter S. Embolism Risk Analysis: Helium Versus Carbon Dioxide. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A.* 2012; 22(8):824-829.
43. Badger WJ. Hurdles to Helium Gas Laparoscopy and a Readily Available Alternative. *J Endourology.* 2008; 22(11):2455-2459.

44. Bongard FS. Helium insufflation for laparoscopic operation. *Surg Gynecol Obstet.* 1993; 177(2):140-146.
45. Makarov DV. Physiologic changes during helium insufflation in high-risk patients during laparoscopic renal procedures. *Urology.* 2007; 70(1):35-37.
46. Shuto K. Hemodynamic and arterial blood gas changes during carbon dioxide and helium pneumoperitoneum in pigs. *Surg Endosc.* 1995; 9(11):1173-1178.
47. Hanly EJ. Abdominal Insufflation With CO₂ Causes Peritoneal Acidosis Independent of Systemic pH. *J Gastrointest Surg.* 2005; 9(9):1245-1252.
48. Sietses C. The influence of CO₂ vs helium insufflation or the abdominal wall lifting technique on the systemic immune response. *Surg Endosc.* 2002; 16(3): 525-528.
49. Hanly EJ. Peritoneal acidosis mediates immunoprotection in laparoscopic surgery. *Surgery.* 2007; 142(3): 357-364.
50. Bicalho PRR. Treatment with Chlorhexidine Modifies the Healing of Colon Anastomosis in Rats. *J Invest Surg.* 2011; 24(1): 8-12.
51. Bicalho PRR. Clinical and histological responses to laparoscopically-induced peritonitis in rats. *Acta Cir Bras.* 2008; 23(5): 456-461.
52. Bicalho PRR. Chlorhexidine as a factor that promotes peritoneal adhesions in rats with induced peritonitis. *Acta Cir Bras.* 2013; 28(9): 641-645.
53. Kassi F. Predictive factors for failure of percutaneous drainage of postoperative abscess after abdominal surgery. *Am J Surg.* 2014; 207(6): 915-921.
54. Levin D. Trends in Use of Percutaneous Versus Open Surgical Drainage of Abdominal Abscesses. *J Am Coll Radiol.* 2015; 12(12): 1247-1250.
55. Soop M. Recent developments in the surgical management of complex intra-abdominal infection. *Br J Surg.* 2017; 104(2): e65-e74.
56. Deitch EA. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock.* 2005; 24(1): 19-23.
57. Brod S. The impact of environmental enrichment on the murine inflammatory immune response. *JCI Insight.* 2017; 2(7): e90723.
58. Wichterman KA. Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 1980; 29(2): 189-201.
59. Mathiak G. An improved clinically relevant sepsis model in the conscious rat. *Crit Care Med.* 2000; 28(6): 1947-1952.
60. Ebong S. Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. *Infect Immun.* 1999; 67(12): 6603-6610.

61. Salgado Jr. WCF. Desenvolvimento de modelo de peritonite bacteriana para avaliação do tratamento mediante acesso laparotômico e video-laparoscópico. *Acta Cir Bras.* 2001; 16(1): 9-12.
62. Parker SJ. Experimental models of Gram-negative sepsis. *Br J Surg.* 2001; 88(1): 22-30.
63. Poli-de-Figueiredo FL. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock.* 2008; 30(7): 53-59.
64. Garrido AG. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. *Acta Cir Bras.* 2004; 19(2): 82-88.
65. Hollenber SM. Mouse models of resuscitated Shock. *Shock.* 2005; 24(1) Suppl:58-63.
66. Hanly EJ. CO₂ Pneumoperitoneum Modifies the Inflammatory Response to Sepsis. *Ann Surg.* 2003; 237(3): 343-350.
67. Hutchins NA. The new normal: immunomodulatory agents against sepsis immune suppression. *Trends Mol Med.* 2014; 20(4): 224-233
68. Gogos CA. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis.* 2000; 181(1):176-180.
69. Cinel I. Molecular biology of inflammation and sepsis: a primer. *Crit Care Med.* 2009; 37(1): 291-304.
70. Fink MP. Animal models of sepsis and its complications. *Kidney Int.* 2008; 74(8): 991-993.
71. Rosch R. Impact of pressure and gas type on adhesion formation and biomaterial integration in laparoscopy. *Surg Endosc.* 2011; 25(11): 3605-3612
72. Jacobi CA. The impact of conventional and laparoscopic colon resection (CO₂ or helium) on intraperitoneal adhesion formation in a rat peritonitis model. *Surg Endosc.* 2001; 15(4): 380-386.