

CRISTINA FAJARDO DIESTEL

**SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM RATOS
SUBMETIDOS A ESPLENECTOMIA TOTAL ISOLADA
OU COMBINADA COM AUTO-IMPLANTE ESPLÊNICO
E A SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM L-
GLUTAMINA**

Orientador: Prof. Dr. Ruy Garcia Marques

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Maria Helena Faria Ornellas de Souza

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas

Rio de Janeiro, RJ

Mai de 2010

CRISTINA FAJARDO DIESTEL

**SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM RATOS
SUBMETIDOS A ESPLENECTOMIA TOTAL ISOLADA
OU COMBINADA COM AUTO-IMPLANTE ESPLÊNICO
E A SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM L-
GLUTAMINA**

Orientador: Prof. Dr. Ruy Garcia Marques

Co-orientadora: Prof. Dr^a. Maria Helena Faria Ornellas de Souza

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas (PG-FISIOCIRURGIA) – da Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, como requisito final para a obtenção do grau de Doutor.

Rio de Janeiro, RJ

Mai de 2010

CRISTINA FAJARDO DIESTEL

**SUBPOPULAÇÕES LINFOCITÁRIAS EM RATOS
SUBMETIDOS A ESPLENECTOMIA TOTAL ISOLADA
OU COMBINADA COM AUTO-IMPLANTE ESPLÊNICO
E A SUPLEMENTAÇÃO DIETÉTICA COM L-
GLUTAMINA**

Tese de Doutorado

**Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas
Faculdade de Ciências Médicas
Universidade do Estado do Rio de Janeiro**

Rio de Janeiro, 26 de maio de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Membros efetivos

Prof. Dr. Alberto Schanaider (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Prof. Dr. Andy Petroianu (Universidade Federal de Minas Gerais)

Prof. Dr. Antonio Felipe Sanjuliani (Universidade do Estado do Rio de Janeiro)

Prof. Dr. Francisco José Barcellos Sampaio (Universidade do Estado do Rio de Janeiro)

Prof. Dr. Ruy Garcia Marques – Orientador (Universidade do Estado do Rio de Janeiro)

Membros suplentes

Prof. Dr. Marcos Bettini Pitombo (Universidade do Estado do Rio de Janeiro)

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

UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Reitor: Prof. Ricardo Vieiralves de Castro

Vice-reitora: Prof.^a Maria Christina Paixão Maioli

**Sub-reitora de Pós-graduação e pesquisa: Prof.^a Dr.^a Mônica da Costa
Pereira Lavalle Heilbron**

Diretor do Centro Biomédico: Prof. Dr. Paulo Roberto Volpato Dias

Diretor da Faculdade de Ciências Médicas: Prof. Plínio José da Rocha

**Coordenador do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e
Ciências Cirúrgicas (PG-FISIOCIURGIA): Prof. Dr. Francisco José
Barcellos Sampaio**

**Coordenador Adjunto do Programa de Pós-graduação em
Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas (PG-FISIOCIURGIA): Prof. Dr.
Ruy Garcia Marques**

Trabalho realizado no Laboratório de Cirurgia Experimental – Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas – PG-FISIOCIRURGIA – da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

A meu marido Ricardo José Fittipaldi Fernandez, pela paciência, apoio e
incentivo sempre.

A meu pai, Raul Diestel, e a minha mãe, Maria do Carmo Fajardo.

Aos meus orientadores Ruy Garcia Marques e Maria Helena Faria Ornellas
de Souza.

AGRADECIMENTOS

Ao final de mais esta etapa importante, existem pessoas a quem desejo agradecer, pois estiveram comigo na realização do meu trabalho.

Aos meus orientadores, Professores Ruy Garcia Marques e Maria Helena Faria Ornellas de Souza, pelos inúmeros ensinamentos transmitidos e pela grande paciência. Gostaria que soubessem que os admiro muito e que, com certeza, seus exemplos são um estímulo para a continuação de minha vida acadêmica.

Ao Dr. Carlos Eduardo Rodrigues Caetano e ao aluno de iniciação científica Marcos Rosa Ferreira, médico-veterinário e graduando de Medicina do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ, respectivamente, pelo apoio e auxílio nos trabalhos no laboratório, principalmente na realização dos procedimentos cirúrgicos experimentais.

Às biólogas Simone Mattioda Lima, pelo inestimável auxílio com as aquisições e análises por citometria de fluxo, e Helena Pazos, doutoranda deste programa de pós-graduação, pelo auxílio na confecção das lâminas.

À aluna de iniciação científica Gabriela Moscoso, graduanda de Nutrição, pelo grande auxílio no cuidado com os animais e nos procedimentos de laboratório.

À minha grande amiga e nutricionista Nara Limeira Horst, Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia Clínica e Experimental – UERJ, pelo seu grande auxílio em várias etapas da realização desta pesquisa.

Ao Prof. José Firmino Nogueira Neto e a toda equipe do Laboratório de Lípidos (LabLip) da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ, pelo auxílio com a realização dos hemogramas.

Aos meus amigos e nutricionistas Márcia Regina Simas Gonçalves Torres, Fernanda da Silveira Osso e José Aroldo Lima Gonçalves Filho pelo incentivo constante e grande apoio em minhas atividades de trabalho durante a realização desta tese.

Às minhas chefes, nutricionistas Denise Dutra Weiner, Liv Katiuska, Patrícia Reis e Simone Ribas, pelo apoio e compreensão de minhas ausências durante o desenvolvimento desta pós-graduação.

Às residentes de Nutrição dos Programas de Nutrição em Cirurgia e Suporte Nutricional, Liliane Soares Correia, Nathália Graça, Verônica Lima, Mariana Costa, Paula Conceição Sobral, Aline Széliga e Cecília Silveira, pela compreensão de minhas constantes ausências para o desenvolvimento desta pesquisa.

Às demais pessoas que contribuíram, de alguma maneira, para que este trabalho pudesse ser realizado.

ÍNDICE

	Página
Lista de abreviaturas e siglas	
Lista de tabelas	
Lista de figuras	
Resumo	
Abstract	
1 – INTRODUÇÃO	01
2 – OBJETIVO	13
3 – MÉTODO	14
3.1 – Animais e grupos	14
3.2 – Composição da ração comercial	15
3.3 – Suplementação dietética com L-glutamina	16
3.4 – Controle do peso	16
3.5 – Procedimento operatório	16
3.5.1 – Esplenectomia total isolada	17
3.5.2 – Esplenectomia total combinada com auto-implante esplênico	17
3.6 – Controle pós-operatório	18
3.7 – Análises sanguíneas	18
3.7.1 – Hemograma (série branca)	19
3.7.2 – Análise por citometria de fluxo do sangue periférico	19
3.8 Análise do baço e dos auto-implantes esplênicos	22
3.8.1 – Processamento do material	22
3.8.2 – Contagem de células	23
3.8.3 – Análise por citometria de fluxo das células de baço ou auto-implante esplênico	24

3.9 – Análise estatística	24
3.10 – Aspectos éticos no cuidado com animais	25
4 – RESULTADOS	26
4.1 – Evolução dos animais	26
4.2 – Evolução do peso corporal	26
4.3 – Peso dos baços	26
4.4 – Regeneração do tecido esplênico auto-implantado	26
4.4.1 – Análise morfológica dos implantes esplênicos regenerados	30
4.5 – Análises sangüíneas	30
4.5.1 – Hemograma (série branca)	30
4.5.2 – Citometria de fluxo	32
4.6 – Análise de células no baço e nos auto-implantes esplênicos	38
5 – DISCUSSÃO	46
6 – CONCLUSÃO	60
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61
8 – APÊNDICE	82
9 – ANEXO 1	108
10 – ANEXO 2	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIE – auto-implante esplênico

ANOVA – análise de variância

APC – *antigen-presenting cell* (célula apresentadora de antígenos)

BLPA – bainha linfóide periarteriolar

BSA – *bovine serum albumine* (albumina de soro bovino)

C₃ – fator de complemento 3

CD – *cluster differentiation* (*cluster* de diferenciação)

DP – desvio padrão

EDTA – ácido etilenodiamino tetra-acético

ET – esplenectomia total

FB – fator B

FSC – *forward side scatter* (ângulo de dispersão frontal do Laser)

GLN – glutamina

HJ – Howell-Jolly

ICAM-1 – molécula de adesão citoplasmática 1

IFPE – infecção fulminante pós-esplenectomia

IgD – imunoglobulina D

IgM – imunoglobulina M

Lablip – Laboratório de Lípidos

LFA1 – *lymphocyte function-associated antigen 1* (antígeno 1 associado à função linfocitária)

MHC – *Main Histocompatibility Complex* (antígeno principal de histocompatibilidade)

NK – *natural killer*

PBS – *phosphate buffered saline* (solução salina tamponada com fosfato)

SSC – *side scatter* (ângulo de dispersão lateral do Laser)

T_c – linfócito T citotóxico

T_h – linfócito T auxiliar (*helper*)

T_{h1} – linfócito T auxiliar tipo 1

T_{h2} – linfócito T auxiliar tipo 2

UERJ – Universidade do Estado do Rio de Janeiro

ZMB – zona marginal de baço

LISTA DE TABELAS

	Página
Tab. 1. Anticorpos monoclonais usados no estudo e suas especificidades.	20
Tab. 2. Análise descritiva do peso dos animais (g) nos diversos grupos de animais, nas semanas 0, 6 e 12 (n=7, em todos os grupos).	27
Tab. 3. Análise descritiva do peso dos baços (g), nos grupos II, III, IV, VI, VII e VIII, no momento do procedimento cirúrgico (n=7, em todos os grupos).	28
Tab. 4. Análise descritiva do peso dos auto-implantes esplênicos regenerados (g e % da massa implantada) nos grupos III (recuperados na 12. ^a semana) e IV (recuperados na 6. ^a semana) (n=7, em todos os grupos).	29
Tab. 5. Análise comparativa das variáveis do hemograma (série branca) observadas no início do experimento (D0) (grupos I a VIII) e na semana 12 (grupos I, II, III, V, VI e VII) – valores de <i>p</i> (n=7, em todos os grupos).	32
Tab. 6. Análise comparativa das variáveis observadas na série branca do hemograma nas semanas 0 e 12 (grupos I, II, III, V, VI e VII) e 0 e 6 (grupo IV e VIII) do experimento, em cada grupo de animais – valores de <i>p</i> .	33
Tab. 7. Análise comparativa da contagem relativa (%) das subpopulações linfocitárias no sangue periférico nas semanas 0 e 12 (grupos I, II, III, V, VI e VII) e 0 e 6 (grupo IV e VIII) do experimento, em cada grupo de animais – valores de <i>p</i> .	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
Fig. 1. Auto-implante esplênico regenerado após seis (A) e 12 (B) semanas, em meio ao omento maior.	29
Fig. 2. Fotomicrografias de cortes de auto-implantes esplênicos regenerados nas 6. ^a e 12. ^a semanas de experimento, em animais não suplementados (A – grupo IV; B – grupo III) e suplementados com L-glutamina (C – grupo VIII; D – grupo VII), respectivamente, submetidos a coloração com hematoxilina e eosina. (10 X)	31
Fig. 3. Evolução da contagem absoluta (células/mm ³) de leucócitos, ao início e ao final do experimento, em cada grupo de animais.	34
Fig. 4. Evolução da contagem absoluta (células/mm ³) de linfócitos, ao início e ao final do experimento, em cada grupo de animais.	34
Fig. 5. Comparação da contagem relativa de linfócitos T (A), T-CD4 (B), T-CD8 α (C), T-CD8 β (D) e linfócitos B de zona marginal do baço (E) no sangue periférico nos grupos de animais, após 12 semanas de experimento.	36
Fig. 6. Comparação da contagem relativa de linfócitos T (A), T-CD4 (B), T-CD8 α (C), T-CD8 β (D) e linfócitos B de zona marginal do baço (E) no sangue periférico nos grupos de animais submetidos a esplenectomia total combinada com auto-implante esplênico após 6 (grupos IV e VIII) e 12 semanas (grupos III e VII) de experimento.	37

- Fig. 7. Representação, em *dot plots*, da marcação por imunofenotipagem dos tipos celulares analisados no sangue periférico: A – controle; B – células T- CD3; C – células T- CD4; D – células T- CD8 α ; E – células T- CD8 β ; F – células B de zona marginal do baço. 41
- Fig. 8. Comparação do número de células brancas nos baços e auto-implantes esplênicos retirados nas 6.^a e 12.^a semanas do experimento. 42
- Fig. 9. Comparação da contagem relativa de linfócitos T (A), T- CD4 (B), T- CD8 α (C), T- CD8 β (D) e linfócitos B de zona marginal do baço (E) na suspensão de células de baços e de auto-implantes esplênicos recuperados nas 6.^a e 12.^a semanas do experimento. 43
- Fig. 10. Comparação da contagem absoluta (células / g tecido) de linfócitos T (A), T- CD4 (B), T- CD8 α (C), T- CD8 β (D) e linfócitos B de zona marginal do baço (E) na suspensão de células de baços e de auto-implantes esplênicos recuperados nas 6.^a e 12.^a semanas do experimento. 44
- Fig. 11. Representação, em *dot plots*, da marcação por imunofenotipagem dos tipos celulares analisados nos baços e nos auto-implantes esplênicos, detectados por imunofenotipagem: A – controle; B – células T- CD3; C – células T- CD4; D – células T- CD8 α ; E – células T- CD8 β ; F – células B de zona marginal do baço. 45

RESUMO

A esplenectomia total (ET) acarreta alterações na resposta imune que aumentam o risco de desenvolvimento de infecções graves. Objetivou-se determinar as subpopulações linfocitárias no sangue, nos baços e nos auto-implantes esplênicos (AIE), em ratos submetidos a ET isolada ou combinada com AIE (ET+AIE) e a suplementação dietética com L-glutamina (GLN). Utilizou-se ratos *Sprague-Dawley* submetidos a operação simulada, ET e ET + AIE, com AIE recuperados após seis e 12 semanas do início do experimento, e com e sem GLN. A suplementação ocorreu diariamente, nos 15 dias que antecederam a coleta sangüínea realizada imediatamente antes dos procedimentos operatórios (D0), após 12 semanas da operação simulada e ET, e após seis e 12 semanas de ET+AIE. As avaliações foram realizadas por meio de hemograma e citometria de fluxo (CF). A análise estatística utilizou testes paramétricos e não-paramétricos, sendo $p < 0,05$ considerado para a rejeição da hipótese nula. ET acarretou diminuição da contagem relativa de linfócitos T totais e T-CD4 no sangue, mas GLN evitou a diminuição do percentual de células T-CD4; AIE, após 12 semanas de experimento, propiciou a manutenção da contagem relativa de linfócitos T totais e T- CD4 no sangue, e dentre esses animais, aqueles que receberam GLN, apresentaram contagens relativas de linfócitos T- CD4 maiores que animais esplenectomizados sem suplementação; AIE, após seis semanas de experimento, associado a GLN, ocasionou contagens absoluta e relativa de linfócitos T- CD4 no sangue significativamente maiores que em animais submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, com o mesmo tempo de avaliação, mas sem GLN; GLN manteve o número de células brancas / g de tecido nos AIE, em comparação ao encontrado nos baços de animais saudáveis; após período de regeneração de 12 semanas, AIE apresentaram contagem relativa de linfócitos B de zona marginal do baço semelhante à encontrada nos baços

de animais saudáveis, o que não ocorreu com período de regeneração de seis semanas. O auto-implante esplênico em ratos, após esplenectomia total, associado à suplementação dietética com L-glutamina, foi capaz de reverter alterações observadas em algumas das subpopulações linfocitárias, ocasionadas pela esplenectomia.

Palavras-chave: baço, esplenectomia, infecções, sistema imune, glutamina.

ABSTRACT

Total splenectomy (TS) causes changes in the immune response that increase the risk of development of severe infection. The objective of the present study was to determine the lymphocyte subpopulations in blood, spleen, and splenic auto-implants (SAI) of rats subjected to TS alone or in association with SAI (TS + SAI) and to dietary supplementation with L-glutamine (GLN). *Sprague-Dawley* rats were subjected to sham surgery, to TS, and to TS + SAI, with SAI retrieved six and 12 weeks after the beginning of the experiment, with and without GLN. Supplementation was provided daily for 15 days preceding the blood collection performed immediately before the surgical procedures (D0), 12 weeks after sham surgery and TS, and six and 12 weeks after TS + SAI. Blood count and flow cytometry were used for the evaluations. Data were analyzed statistically by parametric and nonparametric tests, with the level of significance set at $p < 0.05$. TS caused a reduction in the relative counts of total T and T-CD4 lymphocytes in blood, but GLN prevented the reduction in the percentage of T-CD4. After 12 weeks of the experiment, SAI favored the maintenance of the relative count of total T and T-CD4 lymphocytes in blood, and the animals receiving GLN presented higher relative T-CD4 counts than unsupplemented splenectomized animals. After six weeks of the experiment, SAI combined with GLN caused significantly higher absolute and relative T-CD4 lymphocyte counts compared to animals subjected to the same surgical procedure but receiving no GLN. GLN maintained the number of white cells/g tissue in SAI animals compared to those detected in the spleen of healthy animals. After a 12 week period of regeneration, SAI presented a relative B lymphocyte of the marginal zone of the spleen count similar to that detected in the spleen of healthy animals, a fact that did not occur after period of regeneration of six weeks. Splenic auto-implant in rats after total splenectomy, associated with

dietary supplementation with L-glutamine, in some of the lymphocyte subpopulations, was able to reverse the changes induced by splenectomy.

Key-words: spleen, splenectomy, infections, immune system, glutamine.

1 – INTRODUÇÃO

O baço é o maior órgão do sistema mononuclear fagocitário e o mais vascularizado do corpo humano. Seu peso é de, aproximadamente, 200 gramas, localiza-se no andar superior do abdome, no hipocôndrio esquerdo, relacionando-se topograficamente com o diafragma, estômago, rim, pâncreas e cólon; sua cor é vermelha escura e sua consistência frágil.[1,2] Neste órgão, as células do sistema imune estão presentes em grande número, 25% de todos os linfócitos T e 10-15% de todos os linfócitos B,[1] sendo responsável por importantes funções, como o início da resposta imune, com a realização de fagocitose e a produção de anticorpos, além de hematopoiese (notadamente, na vida intra-uterina), filtragem sanguínea e armazenamento.[1,2]

Estruturalmente, o baço divide-se em dois compartimentos: a polpa vermelha e a polpa branca.[1,2] A polpa vermelha predomina na periferia, embora também seja observada nas porções centrais do baço, e a sua cor se deve ao grande número de eritrócitos. A polpa branca, de localização mais centralizada no órgão, geralmente na proximidade de trabéculas, caracteriza-se por um acúmulo de linfócitos.[3]

A polpa vermelha constitui a maior parte do baço e nela residem macrófagos, plaquetas, hemácias, células dendríticas, linfócitos esparsos (especialmente linfócitos T), plasmócitos e uma rede de fibras reticulares que se dispõe na forma de sinusóides.[4] Deve-se aos macrófagos que se encontram aglomerados na malha periarteriolar da polpa vermelha a remoção de bactérias opsonizadas, plaquetas e hemácias senescentes ou alteradas, células apoptóticas e outros materiais estranhos.[2,5]

A polpa branca corresponde a 25% do volume total do baço e é dividida em três subcompartimentos: a bainha linfóide periarteriolar (BLPA) (rica em linfócitos T), os folículos linfóides (ricos em linfócitos B) e a zona marginal do baço (ZMB).[1,6]

A BLPA divide-se em bainhas interna e externa.[7] As células da bainha interna são, predominantemente, células T- CD4⁺, ainda que pequeno número de células T- CD8⁺ possa estar presente, assim como células dendríticas e células B migrantes. A bainha externa é um importante local de tráfego linfocitário e é composta por linfócitos pequenos e médios (tanto células T quanto B), macrófagos e, sob estimulação antigênica, plasmócitos, que aí são formados.[1,7]

Os folículos linfóides são compostos principalmente por linfócitos B que, ao reconhecerem o antígeno, diferenciam-se e proliferam-se em plasmócitos, que secretam imunoglobulinas específicas para esse antígeno, sendo o baço o local onde, primariamente, ocorre a síntese de imunoglobulina M (IgM).[8,9] Os folículos contém ainda poucas células foliculares dendríticas e células T- CD4⁺, mas, tipicamente, não contêm células T-CD8⁺. [1] As células dendríticas foliculares, que capturam complexos antígeno-anticorpo e expressam CD23 e moléculas de adesão intracitoplasmática 1 (ICAM-1), são vitais para a função imune.[2]

A ZMB é formada por uma capa de linfócitos T e B, e por macrófagos, situando-se na interface entre as polpas vermelha e branca.[2] Ela apresenta papel importante na atividade imune do baço, pois, recebendo a maior quantidade de sangue que penetra no órgão, retém grande parte dos antígenos, nos prolongamentos de suas células reticulares.[9] A microvasculatura encontrada na ZMB é ímpar, sendo o local onde ocorre o maior acúmulo de linfócitos B do organismo, embora também existam linfócitos auxiliares T_h CD4⁺ (*helper*) – aproximadamente dois terços – e citotóxicos T- CD8⁺. [4]

Diferentes tipos celulares, de origem mielóide e linfóide, habitam a ZMB, por longos ou curtos períodos de tempo. As células B da ZMB são, predominante, células não-recirculantes especializadas na rápida resposta a patógenos sanguíneos e que permanecem nesta zona durante longos

períodos,[10] constituindo-se em uma subpopulação específica de linfócitos B com fenótipo IgM^+/IgD^- , ao contrário dos linfócitos B foliculares, que são IgM^+/IgD^+ . [1] Essas células apresentam resposta rápida após reconhecimento de bactérias e se diferenciam em plasmócitos que produzem IgM, ao mesmo tempo em que adquirem a capacidade de atuar como células apresentadoras de antígenos (APC). [11] Elas também contêm receptores antigênicos específicos para patógenos comuns e encontram-se particularmente bem preparadas para o direcionamento de respostas a antígenos, independentemente de células T. [12] Outra importante observação acerca das células B da ZMB é que os macrófagos dependem delas para a sua manutenção nessa área. Em sua ausência, ou no caso delas não estarem presentes por algum período de tempo, ocorre concomitante perda de macrófagos nesse compartimento esplênico. [13]

O baço é, ainda, a única fonte de tuftsin, um tetrapeptídeo circulante que atua nos neutrófilos, estimulando, continuamente, a sua atividade fagocitária. [14] Este órgão também produz properdina e opsoninas, que também participam do estímulo à fagocitose. Tal função é particularmente importante no período inicial de invasão bacteriana e na prevenção da infecção, pela manutenção de um nível adequado de fagocitose. [15]

Assim, este órgão apresenta papel fundamental na filtragem e remoção de eritrócitos senescentes e alterados, e de plaquetas, na fagocitose de partículas estranhas, bactérias, vírus e leucócitos, na produção de linfócitos T e B, e de imunoglobulinas (notadamente IgM), [16,17] e na produção e processamento de fatores séricos – opsoninas –, com grande habilidade para estimular a fagocitose. [18-20]

O sistema imune representa a principal barreira do hospedeiro contra infecções e tem a capacidade de realizar uma resposta rápida e efetiva contra patógenos invasores. Além disso, pode elaborar um outro tipo de resposta, igualmente eficaz, porém mais lenta e duradoura. Estes dois tipos

de respostas são efetuadas pelos sistemas imunes inato e adaptativo, respectivamente, que atuam conjuntamente.[21,22]

Ambos os sistemas – inato e adaptativo – dependem da atividade dos leucócitos. A imunidade inata é mediada, principalmente, por células fagocitárias (neutrófilos, monócitos e macrófagos), células que liberam mediadores inflamatórios (basófilos e eosinófilos) e células *natural killer* (NK). Todas estas células estão imediatamente disponíveis para o combate contra uma ampla variedade de patógenos, sem exigir prévia exposição a eles, e atuam do mesmo modo, em todos os indivíduos. [21] A ação das células NK também pode ser observada na imunidade adaptativa, haja vista que elas são capazes de produzir diferentes citocinas que participam do desenvolvimento desse tipo de resposta.[23]

A resposta imune que ocorre com a produção de anticorpos a determinado agente infeccioso é conhecida como resposta imune adaptativa ou específica, e é mediada por linfócitos T e B. Os anticorpos são produzidos pelos linfócitos B, em resposta a antígenos, e a sua presença em um indivíduo reflete a exposição prévia a microorganismos. Como os linfócitos B são capazes de desenvolver memória, ou seja, reconhecer o mesmo estímulo antigênico, evitam ou dificultam o restabelecimento de uma doença.[21,22]

Os receptores das células T e B reconhecem antígenos com características distintas. O receptor da célula B pode interagir com moléculas antigênicas livres em solução, enquanto o receptor de célula T reconhece antígenos processados e ligados a uma molécula de superfície, em um *locus* denominado complexo de histocompatibilidade principal (*Main Histocompatibility Complex* – MHC).[24,25]

Existem duas grandes classes de moléculas de MHC, chamadas MHC-classe I e MHC-classe II. As moléculas classe I são encontradas em todas as células, enquanto as moléculas classe II são encontradas em um

conjunto de APC, como as células B, os macrófagos e as células dendríticas. Os linfócitos T podem ser divididos em T *helper* (Th) e T citotóxicos (T_c). As células T_c, como os linfócitos T- CD8⁺, reconhecem antígenos ligados a MHC-classe I; já as células T_h ou linfócitos T- CD4⁺, interagem com antígenos MHC-classe II.[24,25]

CD8⁺ é um co-receptor de linfócitos T amplamente utilizado como marcador de citotoxicidade de linfócitos T. O co-receptor CD8⁺ pode ser expresso em duas isoformas: como homodímero de cadeias alfa (CD8α/α) ou como heterodímero de cadeias alfa e beta (CD8α/β). Embora estruturalmente similares, CD8α/α e CD8α/β apresentam notável diversidade em sua função. A forma heterodimérica é mais comumente expressa em timócitos e em moléculas MHC-classe I, sendo encontrada nos linfócitos T convencionais, onde participa como co-receptor do receptor de células T; já a forma homodimérica, não é capaz de suportar uma seleção positiva convencional, sendo expressa em diferentes tipos celulares independentes da restrição ligada ao MHC e não parece agir como co-receptor eficiente nos linfócitos T.[26]

Os linfócitos T- CD4⁺ podem ser subdivididos em dois grupos: células T *helper* tipo 1 (T_{h1}), que secretam citocinas, como interleucina-2, interferon-γ e fator de necrose tumoral-β, e células T *helper* tipo 2 (T_{h2}), que secretam citocinas, como interleucinas 4, 5, 6 e 10.[25] Células T_{h1} e T_{h2} desempenham papéis distintos em várias condições fisiológicas ou patológicas. Sabe-se que a resposta linfocitária do tipo T_{h1} induz inflamação e citotoxicidade, sendo essencial para a defesa contra patógenos intracelulares, como bactérias e vírus, enquanto que a resposta T_{h2} é antiinflamatória e de grande relevância no auxílio aos linfócitos B na formação de anticorpos, que seriam, especialmente importantes na defesa contra microorganismos extracelulares.[27] As citocinas produzidas pelos

linfócitos T_{h1} inibem a produção das citocinas T_{h2} e vice-versa, por um mecanismo denominado contra-regulação.[27]

A resposta inata, embora menos específica e primária, facilita a instalação da resposta imune específica.[22] O baço parece ser de crucial importância na intermediação entre os dois tipos de resposta do sistema imune, e isso se deve, possivelmente, à função da ZMB, que atua como um filtro seletivo para muitos patógenos sanguíneos. Os macrófagos da ZMB possuem receptores para o reconhecimento de antígenos e propiciam a sua completa eliminação da circulação, ou o seu acúmulo local. Em caso de acúmulo, ocorre ativação das células B de ZMB ou o processamento do patógeno por células dendríticas e subsequente apresentação na polpa branca. Esta cooperação entre os três mais importantes tipos celulares da ZMB demonstra a intermediação entre os sistemas inato e adaptativo da resposta imune.[11]

Durante muito tempo, a realização de esplenectomia total, por lesões esplênicas decorrentes de trauma abdominal ou de manipulações cirúrgicas no andar superior do abdome, foi extremamente difundida e obteve grande aceitação, pela facilidade técnica e por coibir efetivamente a hemorragia.[18,28] Esplenectomias totais eletivas eram também indicadas, rotineiramente, com finalidade diagnóstica ou terapêutica, para estadiamento de doença maligna, por anemia ou trombocitopenia, leucemia, linfoma ou hipertensão porta.[18,28,29] Acreditava-se que a função do baço não era importante e que a asplenia não causaria qualquer consequência danosa em longo prazo.[30-32]

A constatação de que o baço apresenta funções relevantes iniciou-se com evidências experimentais. Em 1891, Bardach (*apud* Morris & Bullock), em trabalho experimental com cães, correlacionou a ocorrência de sepse à esplenectomia.[33] Em 1919, Morris & Bullock, em estudo

experimental com ratos, mostraram que a esplenectomia poderia resultar em aumento da susceptibilidade a infecções.[33]

Em 1952, King e Schumacker Jr descreveram uma associação entre esplenectomia e morte por sepse em crianças portadoras de esferocitose. Este trabalho constitui-se em um marco da literatura para a comprovação da associação entre esplenectomia e sepse.[34] Porém, pelas próximas duas décadas, acreditou-se que este risco estava restrito a crianças.[35]

Diamond, em 1969, chamou a atenção para o que denominou de infecção fulminante pós-esplenectomia (IFPE), entidade clínica distinta de outras sepses ou bacteremias, presentes em indivíduos com baços preservados, alertando para os riscos da asplenia. Mesmo desconhecendo a sua etiologia, propôs que essa doença estava relacionada à eliminação do papel de filtro fagocitário bacteriano e à perda da produção específica de anticorpos.[36]

Posteriormente, Singer (1973) mostrou que o risco de desenvolvimento de IFPE era muito maior do que o previamente imaginado. Em 2.795 pacientes submetidos a esplenectomia total, a frequência de sepse variou entre 4% e 25%, com mortalidade variável de acordo com a indicação cirúrgica, entre 2% e 55%.[37] Este e outros autores demonstraram que a IFPE pode ocorrer tanto em crianças quanto em adultos, desde poucos dias após a remoção do baço até vários anos, sendo mais freqüente dentro dos dois primeiros anos após a realização da esplenectomia total e em crianças (50% a 70% dos casos e até 80% em crianças).[18,30,36,37]

As bactérias que mais freqüentemente induzem o surgimento da IFPE são as encapsuladas, como *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria meningitidis*. [38,39] Polissacarídeos situados na membrana celular externa dessas bactérias, conferem-lhes resistência contra a fagocitose, particularmente na ausência de anticorpos

opsonizantes. Na ausência de baço, o nível de complemento diminui marcadamente e, apesar do anticorpo poder ser opsonico, por si, o déficit de complemento pode prejudicar a opsonização e reduzir as defesas do organismo à invasão de microorganismos.[18,28,29] Bactérias com baixa capacidade patogênica são quase totalmente depuradas pelo fígado, mas, quanto maior essa capacidade (bactérias encapsuladas), menor a função fagocitária hepática e maior a esplênica, independentemente da quantidade de complemento ligado a essas bactérias.[40,41]

As principais modificações na resposta imunitária após esplenectomia são: diminuição dos níveis de IgM, tuftsin, properdina e linfócitos T, e da resposta primária dos anticorpos contra exposição a antígenos; e alteração da função de opsoninas [42], de fator de complemento 3 (C₃) e de fator B (FB), prejudicando, assim, a via alternativa do complemento.[43] Adicionalmente, algumas constatações acerca de alterações hematológicas relacionadas à esplenectomia total também podem contribuir para a alteração da função imune. Observa-se que, após este procedimento cirúrgico, existe aumento no número total de leucócitos,[8,44-46] bem como de linfócitos B periféricos.[47,48] Nota-se, ainda, alterações no número de granulócitos e de linfócitos T totais, T-CD4⁺ e T-CD8⁺, tanto em pacientes [47] quanto em animais.[16,18,49]

É amplamente aceito que essas importantes alterações que ocorrem após a esplenectomia total comprometem o funcionamento do sistema imune [18,19,28,31,38-41,50-57] e diferentes alternativas para a preservação do tecido esplênico vêm sendo empregadas: tratamento conservador não cirúrgico (que tem sido, cada vez mais, adotado para o tratamento do trauma esplênico), ligadura ou embolizações arteriais, coagulações com Laser ou eletrocoagulação, aplicações de agentes hemostáticos tópicos, esplenorrafias e esplenectomias parciais e subtotais.[55,58-63] Todavia, quando há comprometimento do pedículo

vascular, lesão extensa do órgão ou doenças relacionadas a alterações das funções esplênicas, ainda faz-se necessária a realização da esplenectomia total.[64-68]

Sabe-se, desde o final do século XIX, que o baço apresenta capacidade de regeneração [69-71] e, fundamentado em achados clínico-patológicos de implantes esplênicos espontâneos após ruptura do órgão por trauma (esplenose), o auto-implante esplênico heterotópico passou a ser considerado como uma opção na tentativa de preservar as suas funções nos casos em que seja inevitável a sua retirada e que não haja contra-indicação para a preservação de tecido esplênico.[62,72,73]

Diversos estudos demonstraram que, em local adequado, após um período inicial de necrose, que ocorre precocemente, algumas horas após a realização do auto-implante esplênico, ele é capaz de iniciar a sua regeneração.[72,73] A formação de nódulos esplênicos ou neobaços, que começam a se desenvolver dias após o implante e que, após cerca de dois meses, apresentam aspecto macro e microscópico similar ao baço normal,[72,73] contendo polpas vermelha e branca, folículos linfóides e suprimento sangüíneo adequado,[74,75] possibilitam a recuperação de inúmeras funções esplênicas.[49,76] Porém, o fato de ocorrer regeneração morfológica, já a partir de cinco a oito semanas, não significa, necessariamente, que existe regeneração funcional, parecendo que são necessárias entre oito a 12 semanas após a realização do auto-implante esplênico para que ela possa ser observada.[16,77]

Em recente pesquisa experimental com ratos, Marques *et al.* realizaram implante autógeno da massa esplênica total, dividida em cinco fragmentos similares, no omento maior. Com uma, quatro, oito, 12, 16, 20 e 24 semanas os animais foram comparados, entre si e com animais controle (saudáveis) e esplenectomizados, no que se refere ao percentual médio de corpúsculos de Howell-Jolly (HJ) existente no sangue periférico.

Com uma e quatro semanas, ocorreu comportamento similar com animais esplenectomizados e com auto-implante esplênico, ambos com desempenho inferior ao grupo controle. A partir de oito semanas, entretanto, passou a não existir diferença entre os grupos com auto-implante e controle, evidenciando o início da regeneração funcional, no tocante à depuração de corpúsculos de HJ. (Marques *et al.*, dados não publicados)

Diversos outros autores investigaram a função do implante autógeno do baço na depuração sangüínea de substâncias coloidais e bactérias em modelos experimentais com animais, mostrando que a capacidade de depuração depende da presença de um baço funcionante ou de tecido esplênico regenerado.[18,74,78,70] Similarmente, pesquisas clínicas têm mostrado, por meio de técnicas cintilográficas e de métodos laboratoriais indiretos, que a realização de auto-implante esplênico cursa com o restabelecimento de algumas funções do baço, como a capacidade de remover substâncias coloidais, eritrócitos alterados e inclusões corpusculares, como as de HJ, Heinz e Pappenheimer da corrente sangüínea,[76] normalização dos níveis de imunoglobulinas séricas (especialmente IgM),[75,80] de complemento,[75] de plaquetas [68,75] e de linfócitos.[80]

Nos últimos anos, a utilização de suplementação nutricional com o aminoácido glutamina (GLN), em diferentes regimes dietéticos, tem motivado a realização de inúmeros estudos, notadamente no que se refere à sua função imunomoduladora.[81-83] Esse aminoácido, neutro e não-essencial em situações normais, tem sido considerado como condicionalmente essencial, pelo aumento de sua demanda em situações catabólicas.[84,85] Constitui-se no aminoácido mais abundante no plasma e no músculo esquelético, atuando como substrato oxidativo preferencial e sendo avidamente consumido por células de replicação rápida, como

linfócitos, células tumorais, enterócitos e fibroblastos.[84] Além disso, constitui-se no substrato preponderante para a amoniogênese no intestino e no rim, exercendo, assim, importante papel na regulação da homeostase ácido-básica.[84] A GLN, que atua como condutora de nitrogênio entre órgãos pode, ainda, ser precursora de nucleotídeos e glicose.[86]

A importância da GLN na sobrevivência das células do sistema imune, bem como sua proliferação *in vitro*, foi primeiramente relatada no estudo de Ehrensvand *et al.* (1949).[87] Posteriormente, Eagle *et al.* (1956) descreveram que a GLN necessita estar presente em uma concentração 10 a 100 vezes maior que os outros aminoácidos em um meio de cultura celular para que haja sobrevivência e proliferação, e não pode ser substituída por outros substratos, como glutamato ou glicose.[88] Este estudo levou ao desenvolvimento do primeiro meio de cultura de células, e continha fatores de crescimento, glicose, 19 aminoácidos essenciais e não essenciais, em concentrações fisiológicas, e uma alta concentração de GLN (2mM).[88].

As células do sistema imune, como neutrófilos, macrófagos e linfócitos, utilizam glicose e GLN como substratos energéticos principais.[88-95] Porém, estudos recentes têm mostrado que a taxa de utilização de GLN por estas células é similar ou maior que a de glicose.[95,96] Assim, sugere-se que este aminoácido seja importante não somente para a função dessas células, isoladamente, como também para a sua habilidade em produzir uma resposta imune eficiente.[96-98]

A alta taxa de utilização de GLN pelas células do sistema imune é determinada pela enzima glutaminase, encontrada na mitocôndria dessas células.[96] Existe alta atividade desta enzima em todos os órgãos linfóides, como linfonodos, baço, timo, placas de Peyer e medula óssea,[96] e também em linfócitos,[97,98] macrófagos [99] e neutrófilos.[100] Adicionalmente, a atividade da glutaminase aumenta

quando ocorre estímulo à resposta imune (estímulo mitogênico),[101] o que, conseqüentemente, eleva a taxa de utilização de GLN.[98,101-104]

Estudos em animais e em humanos têm, portanto, demonstrado as propriedades imunomoduladoras da GLN.[89,105] Ao se consistir em importante fonte energética para linfócitos, neutrófilos e macrófagos,[97-101] elementos envolvidos na defesa primária e inespecífica, este aminoácido pode desempenhar importante papel na proteção imune contra infecções.[106-109]

A esplenectomia total altera, significativamente, a resposta imune do indivíduo, aumentando, especialmente, o risco de desenvolvimento de IFPE. Contudo, sugere-se que a função esplênica pode ser preservada, ao menos em parte, quando se realiza o auto-implante esplênico. Sendo a glutamina um aminoácido relevante para a função imune, julga-se oportuno verificar se a sua suplementação altera a subpopulação linfocitária em ratos submetidos a esplenectomia total isolada ou combinada com auto-implante esplênico.

2 – OBJETIVO

Determinar as subpopulações linfocitárias no sangue periférico, no baço e nos auto-implantes esplênicos, em diferentes estágios de regeneração, em ratos submetidos a esplenectomia total isolada ou combinada com auto-implante esplênico e a suplementação dietética com L-glutamina.

3 – MÉTODO

Esta experimentação foi realizada no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas, com a colaboração de docentes da Disciplina de Patologia Geral e do Laboratório de Lípidos (LabLip) da Faculdade de Ciências Médicas – Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

3.1 – Animais e grupos

Foram utilizados 56 ratos *Sprague-Dawley* machos (em torno de 45 dias de vida), com peso inicial entre 138 e 171 gramas, randomicamente distribuídos em oito grupos de estudo, cada um com sete animais:

- I – Controle – operação simulada; submetidos a manipulação cirúrgica de órgãos intra-abdominais, sem suplementação de L-glutamina (GLN);
- II – submetidos a esplenectomia total (ET) isolada, sem suplementação de GLN;
- III – submetidos a ET combinada com auto-implante esplênico (AIE), sem suplementação de GLN, para acompanhamento até a 12.^a semana do experimento;
- IV – submetidos a ET combinada com AIE, sem suplementação de GLN, para acompanhamento até a 6.^a semana do experimento;
- V – Controle – operação simulada; submetidos a manipulação cirúrgica de órgãos intra-abdominais, com suplementação de GLN;
- VI – submetidos a ET isolada, com suplementação de GLN;

- VII – submetidos a ET combinada com AIE, com suplementação de GLN, para acompanhamento até a 12.^a semana do experimento;
- VIII – submetidos a ET combinada com AIE, com suplementação de GLN, para acompanhamento até a 6.^a semana do experimento.

Todos os animais foram provenientes do Biotério do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e receberam ração adequada para ratos (Focus 1722 Roedores[®] – Agrocerec) e água *ad libitum*, até obterem o peso ideal para o início do experimento.

Os animais foram alocados em gaiolas apropriadas, em ambiente climatizado, com foto-períodos diários de 12 horas.

3.2 – Composição da ração comercial

A ração padrão (comercial) utilizada (Focus 1722 Roedores[®] – Agrocerec[®]) continha: fósforo (mínimo) – 0,8%; proteína bruta (mínimo) – 22%; extrato etéreo (mínimo) – 4%; matéria fibrosa (máximo) – 8%; matéria mineral (máximo) – 9%; cálcio (máximo) – 1,4%; e umidade (máximo) – 13%.

A ração era enriquecida com vitamina A, vitamina E, vitamina K₃, vitamina B₁, vitamina B₂, vitamina B₆, vitamina B₁₂, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, biotina, colina, L-metionina, lisina, aditivo antioxidante, ferro, zinco, cobre, iodo, manganês, selênio e cobalto.

3.3 – Suplementação dietética com L-glutamina

Os animais dos grupos V, VI, VII e VIII receberam suplementação de GLN, uma vez ao dia, durante os 15 dias que antecederam a coleta sanguínea (dia 0 e 6.^a e 12.^a semanas), na dose de 1,0 g/kg/dia.

A dose diária foi preparada em solução aquosa, em concentração entre 5% e 15%, perfazendo volume final de 3 ml, e administrada por via intragástrica, em *bolus*, com a utilização de agulha metálica de gavagem para ratos (modelo IC810 – Insight Equipamentos Ltda.), sempre no mesmo horário.

Os animais dos grupos I, II, III e IV receberam 3 ml de água filtrada, por via intragástrica, durante o período supracitado, que foi administrada de forma similar à descrita anteriormente, sempre no mesmo horário.

3.4 – Controle do peso

O peso dos ratos de todos os grupos foi aferido diariamente em balança de precisão (modelo AdventureTM – Ohaus[®]), na 1.^a semana de pós-operatório, e semanalmente, após esse período, sempre no mesmo horário.

3.5 – Procedimento operatório

Após jejum de 12 horas, os animais de todos os grupos foram submetidos a anestesia com cetamina (Ketamina[®] – Agener), na dose de 80 mg/kg, e xilazina (Xilazina[®] – Agener), na dose 12 mg/kg, por via intramuscular, seguindo-se tricotomia ampla da parede abdominal.

A anti-sepsia da parede abdominal foi realizada com solução de polivinilpirrolidona-iodo com 1% de iodo ativo (Povidine Alcoólico[®] – VIC Pharma Ind. e Com. Ltda). Todo o procedimento foi realizado sob condição estéril, com utilização de *kit* de instrumentos cirúrgicos e campo fenestrado estéreis para cada animal, obedecendo-se a todos os cuidados de assepsia e anti-sepsia.

O *kit* de material cirúrgico utilizado na operação de cada animal continha: um campo cirúrgico fenestrado, um cabo de bisturi n.º 3, uma lâmina de bisturi n.º 15, uma tesoura de Metzenbaum curva delicada, duas pinças de Hartmann-Halsted, uma pinça de dissecação anatômica, uma pinça de dissecação dente-de-rato e um porta-agulhas de Mayo-Hegar.

O procedimento cirúrgico foi iniciado por meio de laparotomia mediana supraumbilical, com cerca de 3 cm de extensão, e a laparorráfia foi realizada com sutura contínua, em dois planos (planos peritônio-aponeurótico e pele), com fio de ácido poliglicólico 3-0 (Dexon II[®], Brasmédica S/A – São Paulo, SP, Brasil).

Os ratos dos grupos I e V (controles) foram submetidos a laparotomia, com manipulação dos órgãos intra-abdominais.

3.5.1 – Esplenectomia total isolada

Os ratos dos grupos II e VI foram submetidos a ET isolada.

Após a abertura da cavidade abdominal, foi realizada a mobilização do baço para o campo operatório e a ligadura dos vasos esplênicos e esplenogástricos, com fio de categute cromado 3-0 (Categute cromado[®], Ethicon – Johnson & Johnson – São José dos Campos, SP, Brasil), com posterior retirada do órgão.

3.5.2 – Esplenectomia total combinada com auto-implante esplênico

Os ratos dos grupos III, IV, VII e VIII foram submetidos a ET combinada com AIE no omento maior.

Após a realização da ET, conforme descrição no item 3.5.1, o baço, após ser pesado em balança de precisão, foi seccionado transversalmente, em cinco fatias, cada uma com cerca de 2 mm de espessura. As secções esplênicas foram suturadas no omento maior, com sutura contínua,

utilizando fio de ácido poliglicólico 4-0 (Dexon II[®], Brasmédica S/A – São Paulo, SP, Brasil). Os pontos foram dados alternadamente, no omento e no tecido esplênico, de modo a existir interposição de tecido omental entre as fatias esplênicas.

3.6 – Controle pós-operatório

Os animais foram observados no período pós-operatório imediato, até a recuperação de sua atividade física, quando foram recolocados nas gaiolas, passando a ser novamente oferecida ração comercial e água *ad libitum*.

Na 12.^a ou na 6.^a semanas, os animais dos grupos III e VII, e IV e VIII, respectivamente, foram submetidos a laparotomia mediana, com a retirada dos AIE regenerados.

Após a coleta dos tecidos para exame, todos os animais foram mortos por sobredose anestésica com cetamina e xilazina e submetidos ao fechamento da parede abdominal em dois planos – peritônio-aponeurótico e pele – com fio de ácido poliglicólico 3-0 (Dexon II[®], Brasmédica S/A – São Paulo, SP, Brasil).

3.7 – Análises sanguíneas

Por punção cardíaca, sob anestesia intramuscular com cetamina e xilazina, foram coletadas amostras sanguíneas para análise do hemograma e quantificação das subpopulações linfocitárias, imediatamente antes dos procedimentos operatórios (D0 – todos os grupos), após seis semanas da realização de ET combinada com AIE (grupos IV e VIII) e após 12 semanas da realização de operação simulada (grupos I e V), ET isolada (grupos II e VI) e ET combinada com AIE (grupos III e VII).

A punção cardíaca foi realizada com agulha 0,45 x 13 cm (Plascalp[®]) acoplada a uma seringa de 5 ml (Injet[®] – Plascalp[®]). O sangue coletado –

1,5 ml – foi imediatamente acondicionado em tubos Vacutainer (Vacuette[®]), com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético), sendo 0,5 ml destinado à realização de hemograma completo e 1,0 ml à realização de citometria de fluxo.

3.7.1 – Hemograma (série branca)

O hemograma foi realizado por um técnico do Laboratório de Lípidos (LabLip) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro que não tinha conhecimento dos grupos de animais do estudo.

Utilizou-se o Analisador Hematológico Automatizado KX-21N[®] – Sysmex para análise, que, no caso da série branca do hemograma, identifica a leucometria total, a contagem relativa e absoluta de linfócitos e neutrófilos, isoladamente, e de eosinófilos, monócitos e basófilos, conjuntamente.

3.7.2 – Análise por citometria de fluxo do sangue periférico

A quantificação das subpopulações linfocitárias foi realizada imediatamente após a coleta do sangue periférico.

Todos os anticorpos monoclonais utilizados foram adquiridos da Becton & Dickinson *Immunocytometry Systems* (EUA) e estão discriminados na tabela 1. Além destes, também foi utilizado o anticorpo *Rat anti-mouse kappa PE* para conferir fluorescência ao OX – 38 purificado.

Inicialmente, realizou-se a identificação de quatro tubos para cada amostra, a saber: tubo 1 – controle negativo (sem anticorpo); tubo 2 – linfócitos T totais, T- CD8 α e T- CD8 β ; tubo 3 – linfócitos B de zona marginal do baço; e tubo 4 – linfócitos T- CD4.

Uma alíquota de 10 µl de sangue periférico foi adicionada a 190 µl de solução de Turk, para lise de hemácias e posterior contagem de leucócitos em câmara de Neubauer. Em cada um dos tubos acima descritos, adicionou-se uma alíquota de sangue periférico que continha o correspondente a $0,7 \times 10^6$ leucócitos. Também, em cada um dos tubos, acrescentou-se 1 µg dos respectivos reagentes para marcação das subpopulações linfocitárias: tubo 2 – anticorpos monoclonais CD3-PE, CD8 α -PerCP e CD8 β -FITC; tubo 3 – linfócitos B-FITC; e tubo 4 – CD4. Os tubos foram homogeneizados e incubados por 15 minutos a 4° C, no escuro. Aos tubos 1, 2 e 3, adicionou-se 2 ml de solução de lise de hemácias (FACS Lysing Solution[®], Becton Dickinson), previamente diluída a 10% em água destilada; seguiu-se homogeneização por 1 min em um agitador elétrico e incubação por 10 min, no escuro.

Tab. 1. Anticorpos monoclonais usados no estudo e suas especificidades.

Clone	Especificidade
1F4	Antígeno CD3 em timócitos, linfócitos T periféricos e em células T dendríticas epidermais
OX – 38	Antígeno CD4 em timócitos, uma subpopulação de linfócitos T, monócitos, macrófagos e algumas células dendríticas
OX – 8	Domínios proximais de membrana da cadeia α de 32-kDa do antígeno de diferenciação do CD8; macrófagos também expressam cadeias α e β de CD8
341	Cadeia β do antígeno do CD8 na maioria dos timócitos e em uma subpopulação de linfócitos T maduros; macrófagos também expressam cadeias α e β de CD8
HIS57	Antígeno desconhecido que é altamente expresso pela maioria das células B de zona marginal no baço

A suspensão de células foi centrifugada (centrífuga 80-2B Centribio[®]) a 1.500 rpm, por 7 min; após descarte do sobrenadante, adicionou-se 2 ml de solução salina tamponada com fosfato 0,01 M e pH entre 7,4 e 7,6, acrescida de soro bovino fetal a 1% (PBS-BSA). As amostras foram novamente centrifugadas, à mesma velocidade, e, após a lavagem e descarte do sobrenadante, o precipitado foi ressuspensão com 0,5 ml de PBS-formol a 10%, para posterior leitura em citômetro de fluxo. Todas estas etapas ocorreram sob refrigeração a 4° C.

No tubo 4, após o período de incubação inicial com o anticorpo primário (OX – 38 purificado), as amostras foram lavadas com solução de PBS-BSA e centrifugadas a 1.500 rpm, seguido por descarte do sobrenadante. Após esta primeira lavagem, foram adicionados 6 µl do segundo anticorpo (*rat anti-mouse kappa* PE). As amostras foram novamente incubadas, durante 15 min, para posterior adição de solução de lise de hemácias, (FACS Lysing Solution[®], Becton Dickinson) previamente diluída a 10% em água destilada, e homogeneização em agitador elétrico por 1 min. Os tubos foram incubados durante mais 10 min, no escuro, e centrifugados por 7 min, a 1.500 rpm. Após descarte do sobrenadante, adicionou-se 2 ml de PBS-BSA para nova lavagem das células. Seguiu-se novo descarte do sobrenadante e ressuspensão das células com 0,5 ml de PBS-formol. Todas estas etapas ocorreram sob refrigeração a 4°C.

Imediatamente após a marcação, as amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo (FACS Calibur[®], Becton-Dickinson), empregando o programa de *software* Cell Quest Pro Software[®] (Becton-Dickinson) para identificação das subpopulações linfocitárias. Foram adquiridas e estocadas ao menos 10.000 células, em cada amostra, na região correspondente a baixa granulosidade (FSC – *Forward Scatter*) e pequeno tamanho (SSC – *Side Scatter*). Os dados obtidos foram analisados por meio do *software*

Paint a Gate[®], originando *dot plots* de intensidade de fluorescência, e tabelas com o percentual de células detectadas por imunofenotipagem.

A aquisição por citometria de fluxo foi realizada por um técnico do Laboratório da Disciplina de Patologia Geral da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro que não tinha conhecimento dos grupos de animais do estudo.

3.8 - Análise do baço e dos auto-implantes esplênicos

3.8.1 – *Processamento do material*

Após a primeira coleta sanguínea (D0), o baço ressecado dos animais dos grupos II e VI foi pesado em balança de precisão e seccionado em duas partes que foram acondicionadas em frascos contendo soro fisiológico gelado (mantido sob refrigeração a 4° C) e outro contendo solução de formalina tamponada a 10%.

Os auto-implantes esplênicos ressecados dos animais dos grupos III e VII (12.^a semana) e IV e VIII (6.^a semana) foram pesados em balança de precisão para determinação da massa esplênica recuperada, divididos em duas partes semelhantes e acondicionados em frasco contendo soro fisiológico gelado (mantido sob refrigeração a 4° C) e outro contendo solução de formalina tamponada a 10%.

Do material acondicionado em frascos contendo soro fisiológico, foi preparada uma suspensão celular. Dos baços provenientes dos animais do grupo II e VII, retirou-se uma alíquota de aproximadamente 200 mg; no caso dos AIE dos animais dos grupos III, IV, VII e VIII, foi utilizada a totalidade do fragmento de auto-implante contido no frasco. Os tecidos foram homogeneizados, cada um com 1 ml de solução de PBS-BSA (solução salina tamponada com fosfato 0,01 M e pH entre 7,4 e 7,6, acrescida de soro bovino fetal a 1%), em homogenizador manual de vidro.

O homogeneizado foi encaminhado para contagem celular ou quantificação das subpopulações linfocitárias (linfócitos T totais, T-CD4⁺, T-CD8α, T-CD8β e linfócitos B de zona marginal do baço).

O material acondicionado em frascos com formalina tamponada a 10% foi preparado para análise histológica. Processou-se o tecido em soluções crescentes de álcool e xilol, que, em seguida, foi incluído em blocos de parafina (Parafina para Histologia[®] – Isofar, Indústria e Comércio de Produtos Químicos – Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e cortado, com o auxílio de um micrótomo (Leica RM20225[®], Leica Instruments – China), em fatias de 4 μm de espessura.

Os cortes foram submetidos a coloração de hematoxilina e eosina, que permitiu a análise da arquitetura histológica esplênica em microscópio óptico (Laborlux S[®], Ernest Leitz – Leitz Portugal).

3.8.2 Contagem de células

Uma alíquota de 10 μl de suspensão de células de baço (preparadas conforme especificação no item 3.7.2) foi adicionada a 190 μl de solução de Turk, para lise de hemácias e posterior contagem de leucócitos em câmara de Neubauer. O número de células por ml foi obtido a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Número de células / ml} = \text{média do número de leucócitos por quadrante} \times \text{inverso da diluição} \times 10^4$$

Desta forma, o número total de correspondeu à quantidade de células/ml multiplicado pelo volume original da suspensão. Assim, sabendo-se o peso de baço homogeneizado e o volume final do homogeneizado, calculou-se a quantidade de células/g de tecido do baço ou de auto-implante esplênico.

3.8.3 Análise por citometria de fluxo das células de baço ou auto-implante esplênico

A análise por citometria de fluxo deu-se com a realização das mesmas etapas descritas no item 3.7.2 para o sangue periférico. Porém, em cada tubo de análise, adicionou-se uma alíquota de suspensão de células de baço ou auto-implante que também continha o correspondente a $0,7 \times 10^6$ leucócitos.

A obtenção do número de cada um dos subtipos celulares foi realizada a partir dos percentuais de cada subtipo observado à citometria de fluxo, referente ao número de células brancas/g de tecido dos baços e AIE.

3.9 – Análise estatística

Todos os dados foram expressos na forma de média \pm desvio padrão.

A comparação dos grupos de animais, no que se refere ao peso corporal e ao peso dos baços no início do experimento, foi realizada por análise de variância (ANOVA) – teste paramétrico – e pelo pós-teste de *Tukey* (usado para comparação dos grupos, dois a dois).

A massa esplênica regenerada nos AIE dos animais dos grupos III vs. IV e VII vs. VIII foram analisados por meio do teste-t de *Student* não pareado.

A comparação das variáveis entre todos os grupos (I a VIII) no início do experimento e entre os grupos I, II, III, V, VI e VII ao final do experimento (12 semanas), bem como a comparação entre a subpopulação linfocitária de baço (ressecado no início do experimento nos animais dos grupos II e VI) e AIE regenerados e ressecados nas 6.^a (grupos IV e VIII) e 12.^a semanas (grupos III e VII), foram realizadas com o teste de *Kruskal-Wallis* – teste não paramétrico – e com o pós-teste de *Dunn* (usado para comparação dos grupos, dois a dois).

A comparação de cada variável na série branca do hemograma e nas subpopulações linfocitárias, entre os valores obtidos após seis e 12 semanas e os do início do experimento, dentro de cada grupo, foi realizada com o teste-t de *Student* pareado.

A análise estatística foi realizada com a utilização do programa *GraphPad Prism 4*[®] – 2003. Em todas as análises, um valor de $p \leq 0,05$ foi estabelecido para a rejeição da hipótese nula de similaridade entre os grupos.

3.10 – Aspectos éticos no cuidado com os animais

O projeto desta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, sob o protocolo número CEA/164/2006. Todos os procedimentos seguiram, rigorosamente, a regulamentação existente sobre experimentação com animais.[110]

4 – RESULTADOS

4.1 – Evolução dos animais

Os animais apresentaram boa evolução, com atividade normal durante todo o experimento, nenhum deles apresentando complicações no período pós-operatório. Todas as análises foram realizadas com sete animais.

4.2 – Evolução do peso corporal

No que se refere ao peso no início do experimento, não houve diferença entre os ratos de todos os oito grupos ($p=0,1912$).

Durante o estudo, ocorreu aumento do peso de todos os animais, que, ao final do experimento (12.^a semana), foi semelhante entre os grupos I, II, III, V, VI e VII ($p=0,8767$).

Ao se comparar o peso dos animais dos grupos IV e VIII na 6.^a semana com os dos ratos dos grupos I, II, III, V, VI e VII, nesse mesmo momento, também não se encontrou diferença ($p=0,5218$). (Tab. 2)

4.3 – Peso dos baços

No que se refere ao peso dos baços aferidos no momento do procedimento cirúrgico, os ratos dos grupos II e VI (ET isolada), III e VII (ET combinada com AIE – 12 semanas) e IV e VIII (ET combinada com AIE – 6 semanas), não apresentaram diferença entre si ($p=0,2109$). (Tab. 3)

4.4 – Regeneração do tecido esplênico auto-implantado

Ocorreu regeneração do AIE em todos os animais dos grupos III, IV, VII e VIII.

Tab. 2. Análise descritiva do peso dos animais (g) nos diversos grupos de animais, nas semanas 0, 6 e 12 (n=7, em todos os grupos).

Grupos	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
0	150,52	8,67	138,02	150,00	162,00
I 6	345,66	43,43	300,31	331,17	427,99
12	398,89	64,84	322,33	393,05	520,88
0	146,21	4,99	138,17	146,31	152,00
II 6	378,91	57,91	286,45	370,63	461,60
12	412,09	76,49	280,22	418,52	529,29
0	149,51	8,36	141,18	148,00	162,00
III 6	363,87	35,25	314,56	361,28	409,61
12	415,42	38,41	360,18	415,43	456,78
0	151,62	6,87	139,89	152,00	160,89
IV 6	348,94	27,44	293,85	350,01	376,74
12	-	-	-	-	-
0	156,42	5,62	147,61	156,00	165,03
V 6	347,86	35,34	305,78	337,01	396,82
12	393,71	44,40	328,51	402,41	457,35
0	155,11	12,56	140,39	155,15	170,63
VI 6	351,27	37,16	319,23	325,41	399,36
12	386,46	18,30	361,85	389,76	408,80
0	157,51	9,39	142,72	158,2	168,27
VII 6	332,75	26,83	302,40	326,77	372,44
12	394,11	37,95	323,30	400,51	430,36
0	155,33	9,05	140,00	154,00	168,27
VIII 6	346,82	36,97	285,49	354,16	397,22
12	-	-	-	-	-

DP – desvio padrão

Tab. 3. Análise descritiva do peso dos baços (g), nos grupos II, III, IV, VI, VII e VIII, no momento do procedimento cirúrgico (n=7, em todos os grupos).

Grupos	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
II	0,86	0,15	0,66	0,88	1,08
III	0,74	0,20	0,44	0,80	1,02
IV	0,85	0,13	0,62	0,84	1,00
VI	0,95	0,26	0,56	0,87	1,34
VII	0,99	0,15	0,80	0,95	1,22
VIII	1,02	0,37	0,60	0,97	1,60

DP – desvio padrão

Na comparação entre os animais dos grupos III (12 semanas) vs. IV (seis semanas) e entre os grupos VII (12 semanas) vs. VIII (seis semanas), não se observou diferença no que se refere à massa esplênica regenerada ($p=0,4316$ para massa regenerada em g e $p=0,7656$ para percentual de massa regenerada em relação à massa implantada, e $p=0,7543$ para massa regenerada em g e $p=0,8111$ para percentual de massa regenerada em relação à massa implantada, respectivamente) (Tab. 4)

A figura 1 ilustra a regeneração de AIE nas 6.^a (A) e na 12.^a (B) semanas, em meio ao omento maior. Das cinco fatias implantadas, três foram recuperadas na 6.^a semana, duas com massa esplênica comparável às das fatias implantadas e outra com massa bem menor; na 12.^a semana, foram recuperadas quatro fatias, duas com massa esplênica maior que as das fatias implantadas (sugerindo, possivelmente, que teria ocorrido fusão de uma terceira fatia às demais) e duas outras com massa comparável à implantada.

Tab. 4. Análise descritiva do peso dos auto-implantes esplênicos regenerados (g e % da massa implantada) nos grupos III (recuperados na 12.^a semana) e IV (recuperados na 6.^a semana) (n=7, em todos os grupos).

Grupos	Média	DP	Mínimo	Mediana	Máximo
III					
g	0,26	0,07	0,10	0,28	0,31
%	38,24	17,47	11,63	34,94	63,64
IV					
g	0,31	0,15	0,11	0,30	0,47
%	35,55	15,43	13,10	30,65	52,38
VII					
g	0,31	0,05	0,22	0,31	0,36
%	31,53	3,73	25,29	31,53	35,79
VIII					
g	0,30	0,08	0,19	0,30	0,45
%	30,81	6,91	20	30,93	43,33

DP – desvio padrão

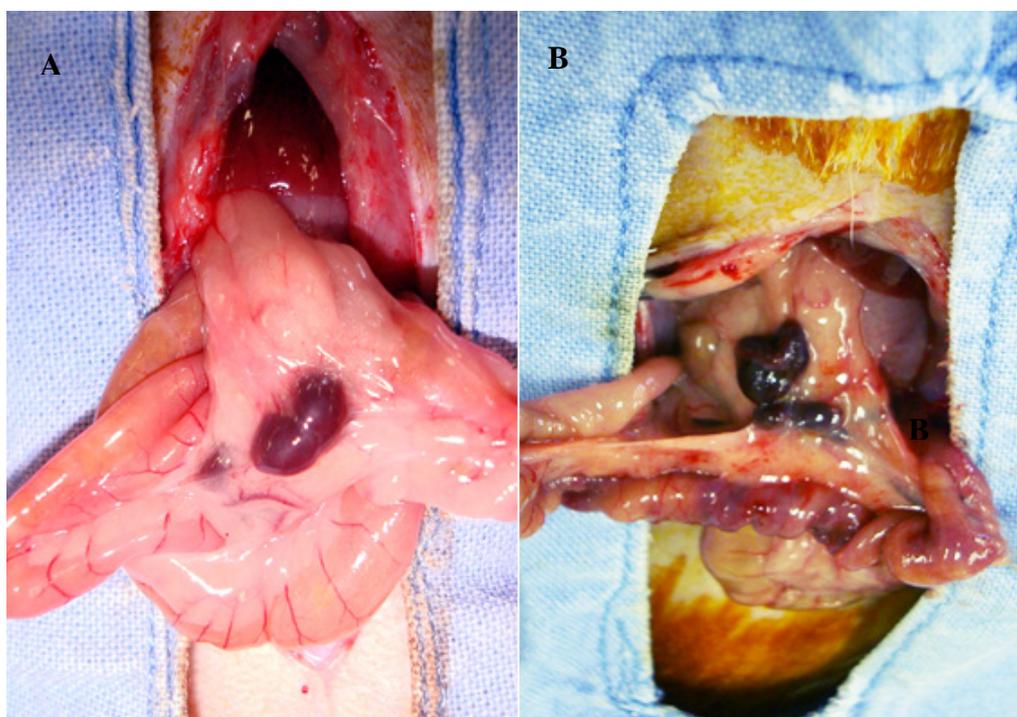


Fig. 1. Auto-implante esplênico regenerado após seis (A) e 12 (B) semanas, em meio ao omento maior.

4.4.1 – Análise morfológica dos implantes esplênicos regenerados

Após serem retirados da solução de formalina tamponada a 10%, os fragmentos esplênicos mostravam, ao exame macroscópico, coloração violácea, pontilhado brancacento escasso e consistência elástica.

À microscopia óptica, sob aumento de 10 x e pela coloração com hematoxilina-eosina, as fotomicrografias da figura 2 mostram os aspectos de AIE regenerados nas 6.^a e 12.^a semanas de experimento, em animais não suplementados (A – grupo IV; B – grupo III) e suplementados com L-glutamina (C – grupo VIII; D – grupo VII), respectivamente.

Não foram encontradas alterações na morfologia dos auto-implantes esplênicos nos animais dos grupos não suplementados com L-glutamina em comparação aos grupos suplementados. Em ambos os casos, foram observadas polpas vermelha e branca, em meio a discreta congestão vascular. Havia pequena redução da polpa branca, em meio a folículos linfóides, com moderado desarranjo estrutural. Contudo, o desarranjo estrutural e a congestão vascular pareceram aumentados na 6.^a semana (A e C) em comparação à 12.^a semana (B e D).

4.5 – Análises sanguíneas

4.5.1 – Hemograma (série branca)

Tanto no início (D0) – todos os grupos – quanto ao final do experimento (grupos I, II, III, V, VI e VII), não foi observada diferença em todas as variáveis analisadas. (Tab. 5)

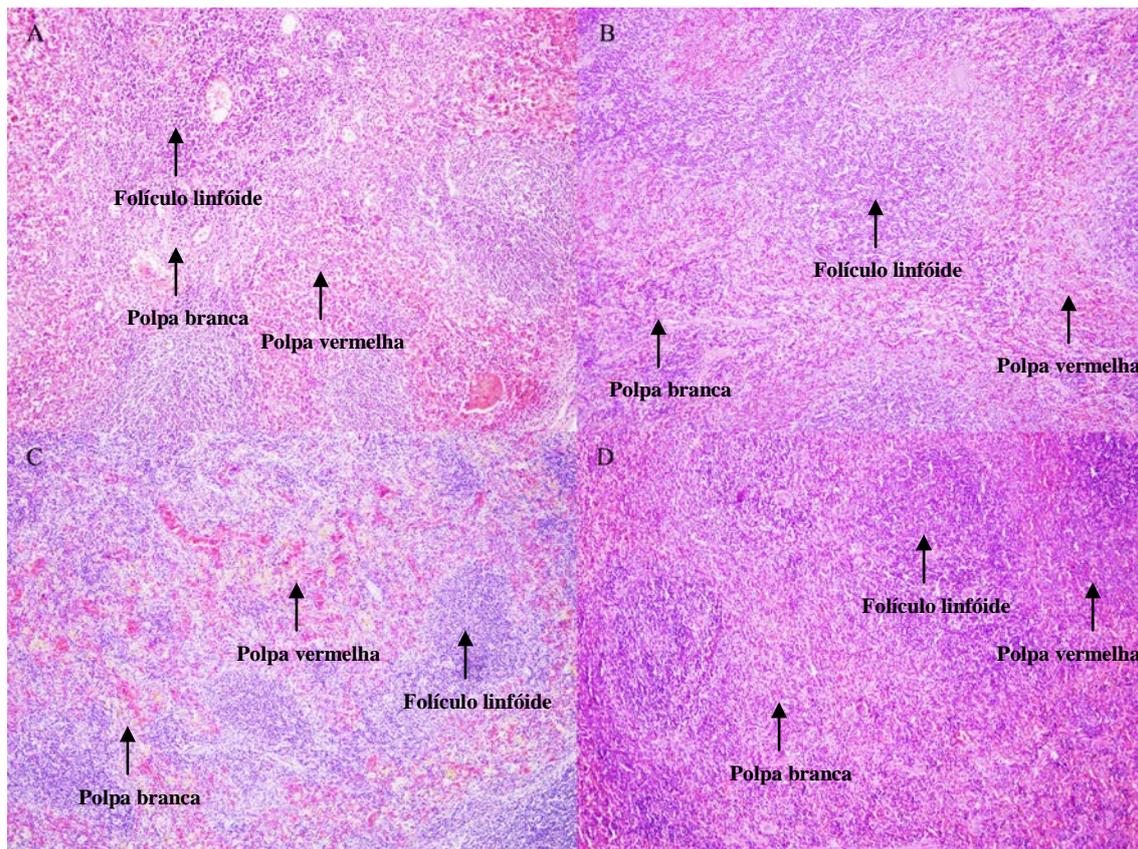


Fig. 2. Fotomicrografias de cortes de auto-implantes esplênicos regenerados nas 6.^a e 12.^a semanas de experimento, em animais não suplementados (A – grupo IV; B – grupo III) e suplementados com L-glutamina (C – grupo VIII; D – grupo VII), respectivamente, submetidos a coloração com hematoxilina e eosina. (10 X)

Ao serem comparadas as séries brancas dos hemogramas dos animais dos grupos III e VII (ET combinada com AIE – 12 semanas) e IV e VIII (ET combinada com AIE – 6 semanas), também não observou-se diferença entre os quatro grupos ($p=0,5746$ para leucócitos; $p=0,5552$ e $p=0,3841$ para contagem relativa e absoluta de linfócitos respectivamente; $p=0,5913$ e $p=0,7580$ para contagem de neutrófilos relativa e absoluta, respectivamente; $p=0,1276$ e $p=0,0558$ para contagem relativa e absoluta de eosinófilos/monócitos/basófilos, respectivamente).

Tab. 5. Análise comparativa das variáveis do hemograma (série branca) observadas no início do experimento (D0) (grupos I a VIII) e na semana 12 (grupos I, II, III, V, VI e VII) – valores de p ($n=7$, em todos os grupos).

VARIÁVEL	D0	SEMANA 12
Leucócitos	0,1315	0,1010
Linfócitos: %	0,7371	0,3711
células/mm ³	0,3630	0,1313
Neutrófilos: %	0,9240	0,3940
células/mm ³	0,5382	0,0931
Eosinófilos, basófilos e monócitos: %	0,5494	0,1997
células/mm ³	0,3161	0,1216

Quando os grupos de animais foram analisados, isoladamente, comparando-os ao início e ao final do experimento, observou-se aumento significativo da contagem absoluta de leucócitos e linfócitos (células/mm³) nos animais dos grupos submetidos a ET isolada (grupos II e VI) e a ET combinada com AIE (grupos III, IV, VII e VIII). (Tab. 6 e Figs. 3 e 4)

4.5.2 – Citometria de fluxo

No início do experimento (D0), não foi observada diferença entre os animais de todos os grupos (I a VIII), em nenhuma das variáveis analisadas no sangue periférico por citometria de fluxo: linfócitos T- CD3 ($p=0,2765$ para contagem absoluta e $p=0,8075$ para contagem relativa), linfócitos T- CD4 ($p=0,3794$ para contagem absoluta e $p=0,4039$ para contagem relativa), linfócitos T- CD8 α ($p=0,2388$ para contagem absoluta e $p=0,5835$ para contagem relativa), linfócitos T- CD8 β ($p=0,1457$ para contagem absoluta e $p=0,7124$ para contagem relativa) e linfócitos B de zona marginal do baço ($p=0,0706$ para contagem absoluta e $p=0,1909$ para contagem relativa).

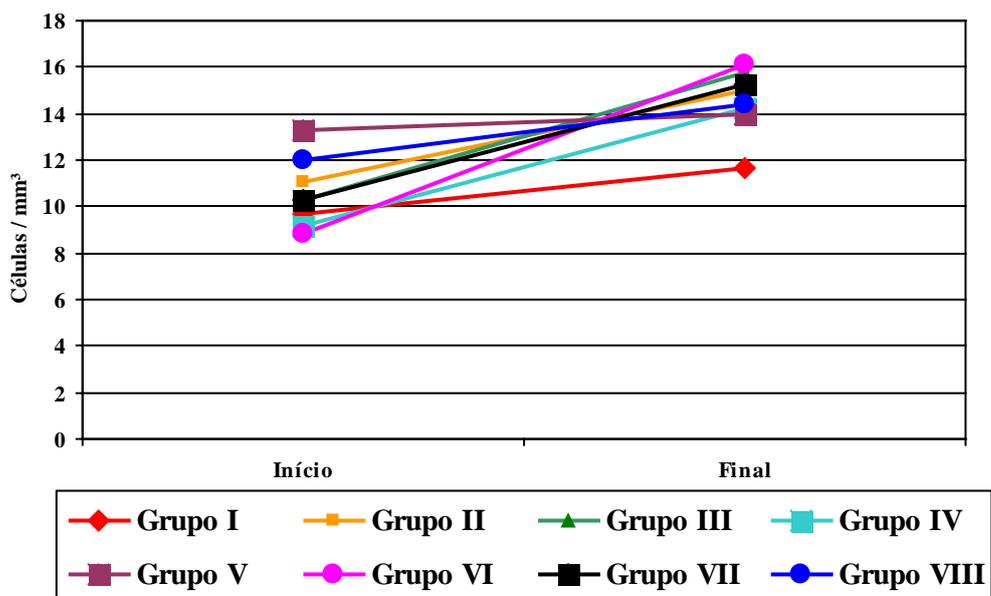


Fig. 3. Evolução da contagem absoluta (células/mm³) de leucócitos, ao início e ao final do experimento, em cada grupo de animais.

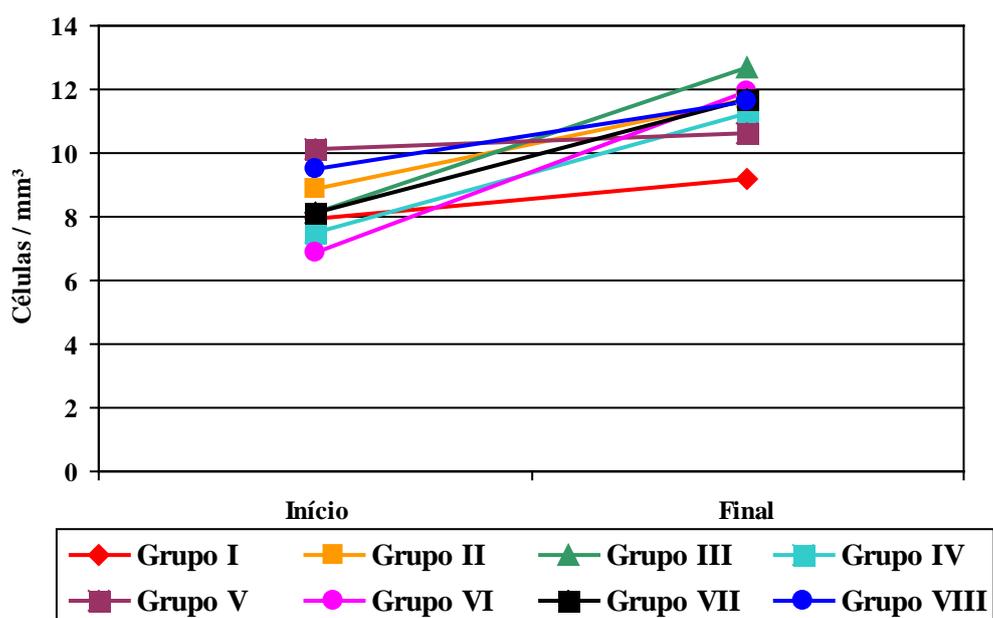


Fig. 4. Evolução da contagem absoluta (células/mm³) de linfócitos, ao início e ao final do experimento, em cada grupo de animais.

Ao final do experimento (12.^a semana), não foi observada diferença entre os ratos dos grupos I, II, III, V, VI e VII, no que se refere aos linfócitos T- CD8 α ($p=0,1028$ para contagem absoluta e $p=0,3473$ para contagem relativa) (Fig. 5C) e na contagem absoluta de linfócitos T- CD8 β

($p=0,1498$) e linfócitos B de ZMB ($p=0,2158$ para contagem absoluta e $p=0,3691$ para contagem relativa) (Fig. 5E). Notou-se diminuição significativa do percentual de linfócitos T- CD8 β nos animais do grupo II em relação aos do grupo V ($p<0,01$). (Fig. 5D) Quando se analisou a contagem de linfócitos T totais e T- CD4, não foi observada diferença em seu número absoluto no sangue periférico dos animais dos grupos analisados ($p=0,2498$ para linfócitos T e $p=0,1396$ para linfócitos T- CD4). Porém, observou-se diminuição significativa da contagem relativa de linfócitos T totais e T- CD4 nos animais do grupo II (ET isolada) quando comparados aos animais dos grupos I (operação simulada) ($p<0,01$ e $p<0,05$, respectivamente) e V (operação simulada + suplementação com L-glutamina) ($p<0,001$ e $p<0,05$, respectivamente), diminuição da contagem relativa de linfócitos T nos animais do grupo VI (ET isolada + suplementação com L-glutamina) em comparação com os ratos do grupo V ($p<0,05$) e diminuição da contagem relativa de linfócitos T- CD4 nos ratos do grupo II em relação aos do grupo VII ($p<0,05$). (Fig. 5A e B)

Ao serem comparados os animais dos grupos III e VII (ET combinada com AIE – 12 semanas) e IV e VIII (ET combinada com AIE – 6 semanas), não se observou diferença no sangue periférico no que se refere aos linfócitos T- CD3 ($p=0,3436$ para contagem absoluta e $p=0,2260$ para contagem relativa) (Fig. 6A), contagem relativa de linfócitos T- CD8 α ($p=0,4267$), (Fig. 6C) linfócitos T- CD8 β ($p=0,7967$ para contagem absoluta e $p=0,9948$ para contagem relativa) (Fig. 6D) e linfócitos B de ZMB ($p=0,1443$ para contagem absoluta e $p=0,1134$ para contagem relativa) (Fig. 6E). Porém, observou-se diminuição significativa na contagem absoluta e relativa de linfócitos T- CD4 nos animais do grupo IV em relação aos dos grupos VII e VIII ($p<0,05$ para ambos em relação à contagem absoluta; e $p<0,05$ e $p<0,01$, respectivamente em relação à contagem relativa). (Fig. 6B)

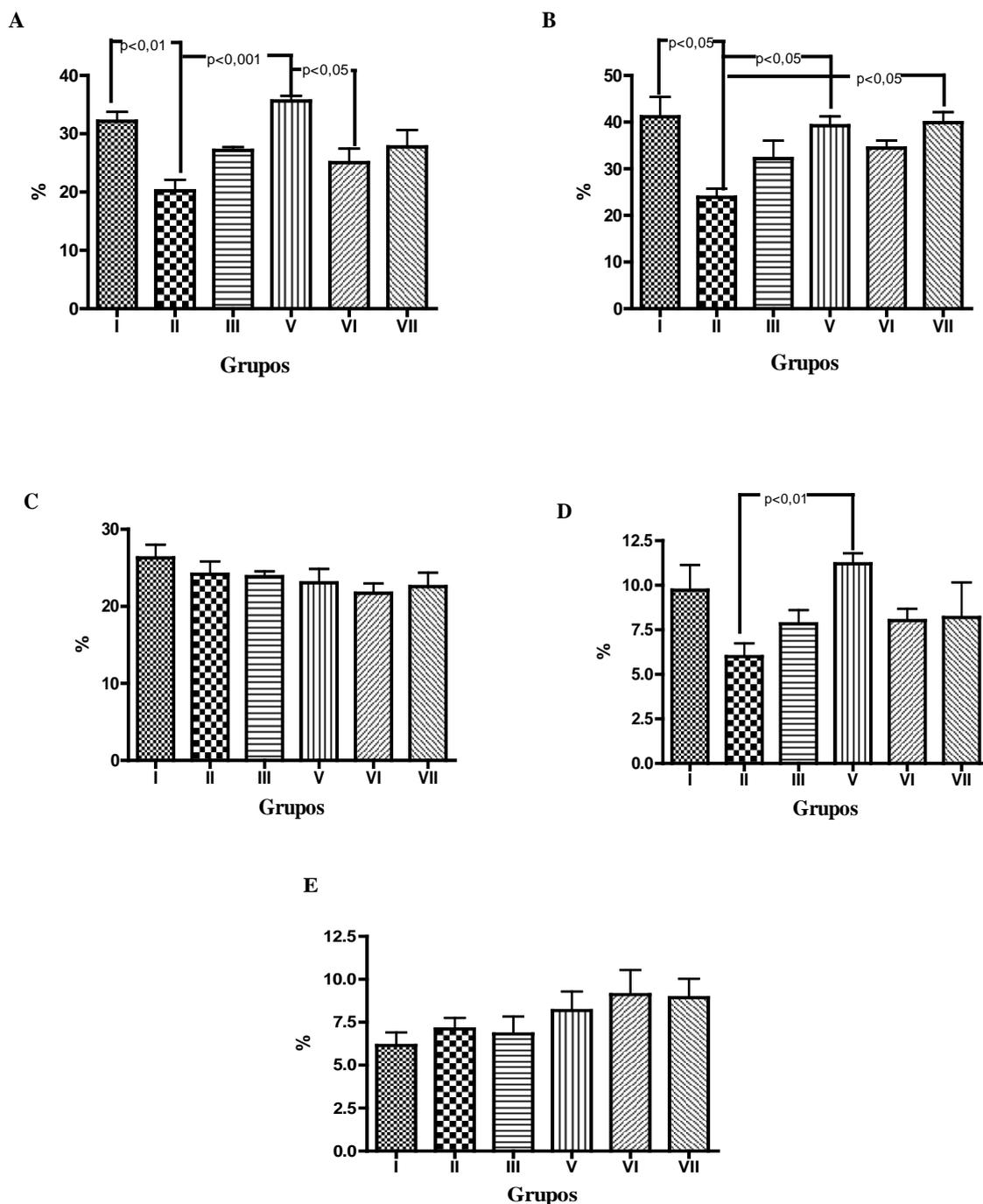


Fig. 5. Comparação da contagem relativa de linfócitos T (A), T-CD4 (B), T-CD8 α (C), T-CD8 β (D) e linfócitos B de zona marginal do baço (E) no sangue periférico nos grupos de animais, após 12 semanas de experimento.

Além disso, observou-se número absoluto maior de linfócitos T- CD8 α nos animais do grupo VII (ET combinada com AIE + suplementação dietética

com L-glutamina – 12 semanas) quando comparados aos do grupo IV (ET combinada com AIE sem suplementação dietética com GLN – 6 semanas) ($p < 0,05$).

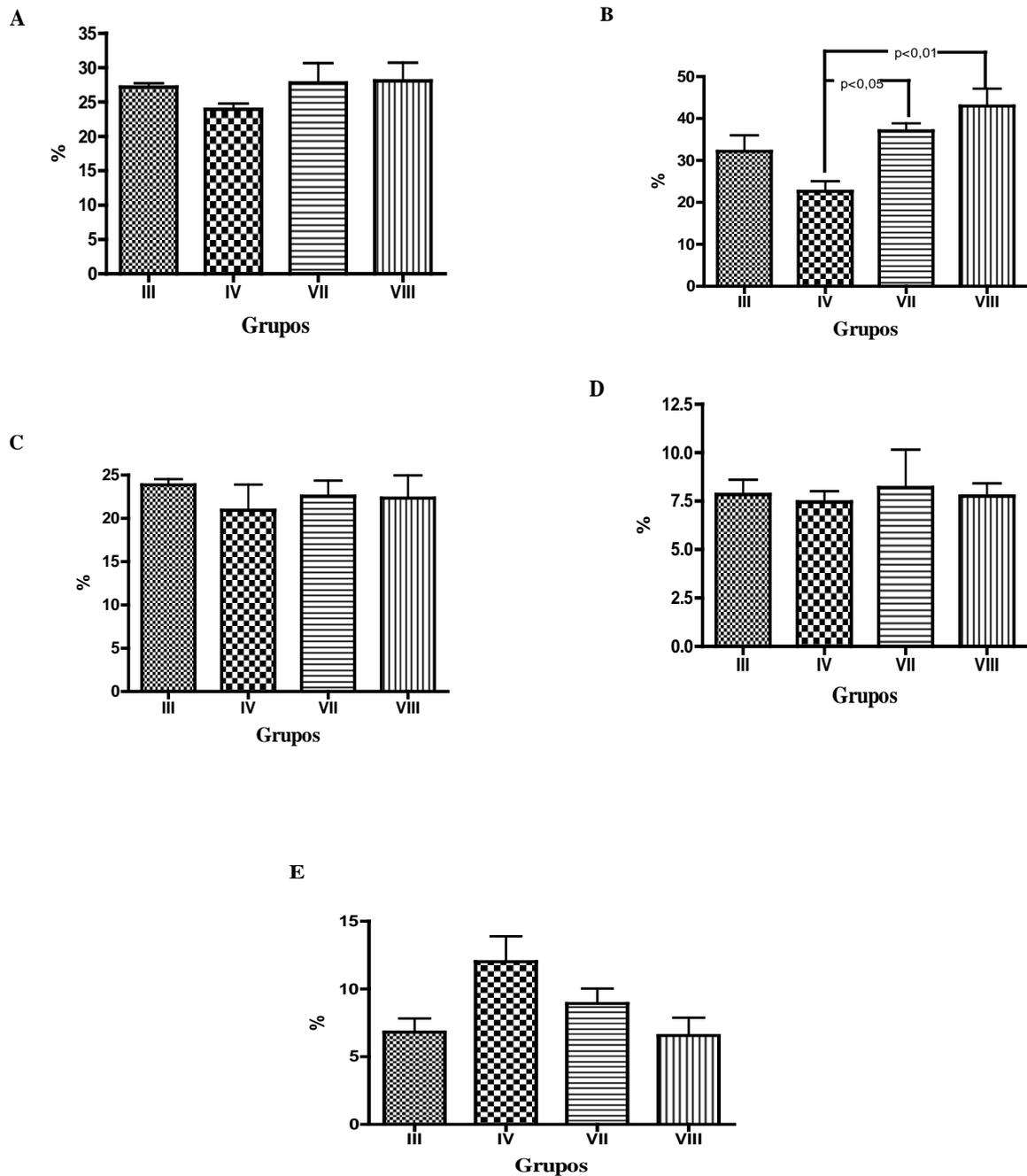


Fig. 6. Comparação da contagem relativa de linfócitos T (A), T- CD4 (B), T-CD8 α (C), T- CD8 β (D) e linfócitos B de zona marginal do baço (E) no sangue periférico nos grupos de animais submetidos a esplenectomia total combinada com auto-implante esplênico após 6 (grupos IV e VIII) e 12 semanas (grupos III e VII) de experimento.

Quando se analisaram isoladamente os grupos de animais, comparando-os ao início e ao final do experimento, observou-se que houve diminuição significativa no percentual de linfócitos T totais nos animais dos grupos II, III, IV, VI, VII e VIII. (Tab. 7). Observou-se, também, diminuição do percentual de linfócitos T- CD4 e T- CD8 β nos animais dos grupos II e IV, além de aumento de linfócitos B de ZMB nos mesmos grupos. (Tab. 7)

A figura 7 ilustra a representação em *dot plots* dos tipos celulares analisados no sangue periférico, detectados por imunofenotipagem.

4.6 – Análise de células no baço e nos auto-implantes esplênicos

Observou-se número significativamente menor de células brancas por grama de tecido nos AIE dos animais dos grupos III (ET combinada com AIE – 12 semanas) (102 ± 52 células/g) e IV (ET combinada com AIE – 6 semanas) ($69 \pm 64 \times 10^6$ células/g) em comparação ao baço retirado dos animais dos grupos II ($486 \pm 226 \times 10^6$ células/g) e VI ($611 \pm 317 \times 10^6$ células/g) ($p < 0,01$ e $p < 0,001$ em relação ao grupo III; e $p < 0,05$ e $p < 0,01$ em relação ao grupo IV). (Fig. 8) No que se refere aos animais dos grupos VII (ET combinada com AIE – 12 semanas) (312 ± 267 células/mm³) e VIII (ET combinada com AIE – 6 semanas) (350 ± 212 células/mm³), não foram observadas diferenças em comparação aos baços retirados dos animais dos grupos II e VI. (Fig. 8)

Ao comparar-se a avaliação realizada na suspensão de células brancas nos baços dos animais do grupo II com a suspensão obtida a partir dos AIE regenerados, observou-se menor contagem relativa de linfócitos T nos AIE, tanto na 6.^a (grupos IV e VIII; $p < 0,05$ para ambos) quanto na 12.^a semana de experimento (grupos III e VII; $p < 0,05$ e $p < 0,001$ respectivamente). Observou-se também, contagem relativa de linfócitos T significativamente menor nos AIE dos animais do grupo VII em comparação ao encontrado nos baços do grupo VI ($p < 0,01$). (Fig. 9A) A contagem absoluta de células T (células / g de tecido) foi significativamente menor nos AIE dos grupos III e IV em relação aos baços dos

grupos II ($p < 0,001$ e $p < 0,01$ respectivamente) e VI ($p < 0,001$ e $p < 0,01$ respectivamente), o que não foi observado em relação aos AIE dos grupos VII e VIII – animais que receberam suplementação de GLN. (Fig. 10A)

A subpopulação de linfócitos T- CD4 apresentou percentual significativamente menor nos AIE dos animais dos grupos III, VII (12.^a semana) e VIII (6.^a semana), em comparação aos baços do grupo VI ($p < 0,05$, para todos). (Fig. 9B) O número de células T- CD4 / g de tecido apresentou significativa diminuição nos AIE dos grupos III e IV em relação aos baços dos grupos II ($p < 0,01$ e $p < 0,05$ respectivamente) e VI ($p < 0,001$ e $p < 0,05$ respectivamente), o que não foi observado em relação aos AIE dos grupos VII e VIII – animais que receberam suplementação de GLN. (Fig. 10B)

Não observou-se diferença entre os baços e os AIE, independentemente se recuperados na 6.^a ou 12.^a semanas, no que se refere ao percentual de linfócitos T- CD8 α ($p > 0,05$ para ambos). (Fig. 9C) Porém, o número de células T- CD8 α / g de tecido apresentou significativa diminuição nos AIE dos grupos III e IV em relação aos baços dos grupos II ($p < 0,001$ e $p < 0,01$ respectivamente) e VI ($p < 0,01$ e $p < 0,05$ respectivamente), o que não foi observado em relação aos AIE dos grupos VII e VIII – animais que receberam suplementação de GLN. (Fig. 10C)

Quando se avaliou a subpopulação de linfócitos T- CD8 β , verificou-se contagem relativa significativamente menor deste grupo celular nos AIE recuperados dos animais do grupo IV (6.^a semana) em relação aos baços dos ratos do grupo II ($p < 0,01$), mas não em relação aos AIE recuperados na 12.^a semana (grupo III). (Fig. 9D) O número de células T- CD8 β / g de tecido apresentou significativa diminuição nos AIE dos grupos III e IV em relação aos baços dos grupos II ($p < 0,001$ e $p < 0,01$ respectivamente) e VI ($p < 0,001$ e $p < 0,01$ respectivamente), o que não foi observado em relação aos AIE dos grupos VII e VIII – animais que receberam suplementação de GLN. (Fig. 10D)

No que se refere aos linfócitos B, observou-se contagem relativa significativamente menor de linfócitos B de ZMB nos AIE recuperados na 6.^a semana (grupos IV e VIII), quando comparados aos baços dos grupos II ($p < 0,05$ para ambos) e V ($p < 0,01$ para ambos), não sendo esta diferença observada nos AIE recuperados na 12.^a semana de experimento, tanto nos animais suplementados quanto nos não suplementados com GLN. (Fig. 9E) Entretanto, o número de células B de ZMB / g de tecido apresentou significativa diminuição nos AIE dos grupos III e IV em relação aos baços dos grupos II ($p < 0,01$ para ambos) e VI ($p < 0,001$ para ambos), o que não foi observado em relação aos AIE dos grupos VII e VIII – animais que receberam suplementação de GLN. (Fig. 10E)

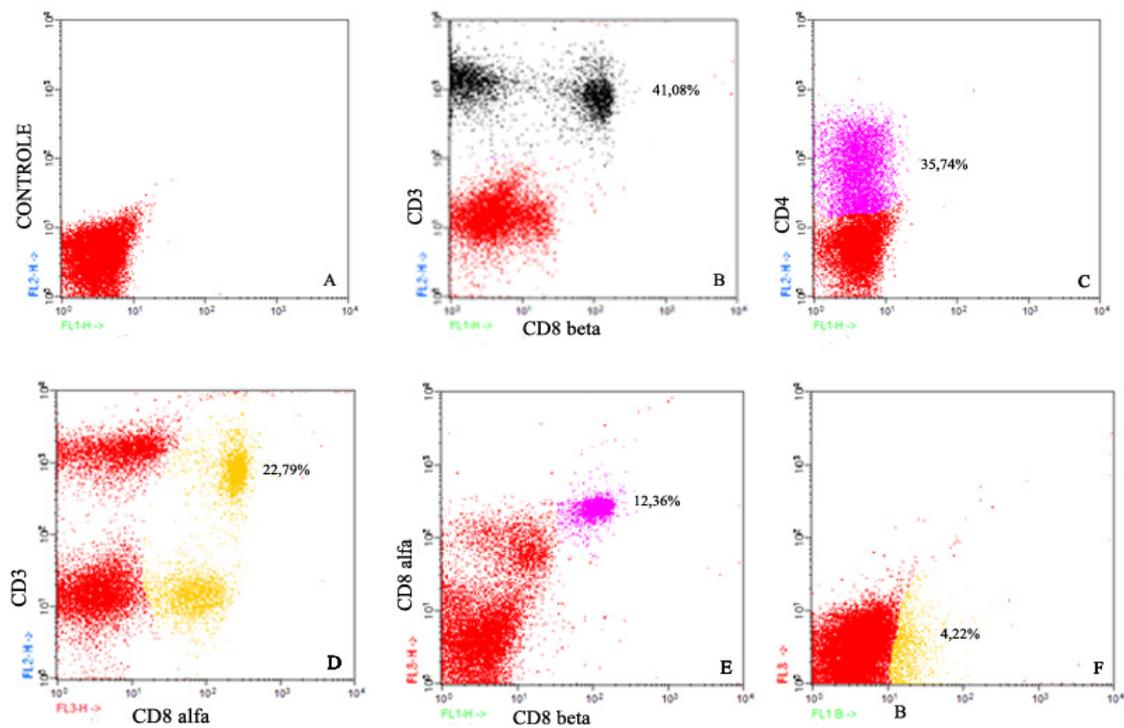


Fig. 7. Representação, em dot plots, da marcação por imunofenotipagem dos tipos celulares analisados no sangue periférico: A – controle; B – células T- CD3; C – células T- CD4; D – células T- CD8 α ; E – células T- CD8 β ; F – células B de zona marginal do baço.

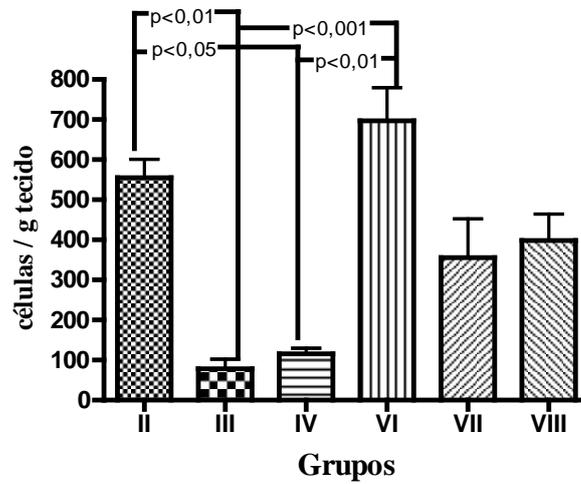


Fig. 8. Comparação do número de células brancas nos baços e auto-implantes esplênicos retirados nas 6.^a e 12.^a semanas do experimento.

A figura 11 ilustra a representação em *dot plots* dos tipos celulares analisados nos baços e nos auto-implantes esplênicos, detectados por imunofenotipagem.

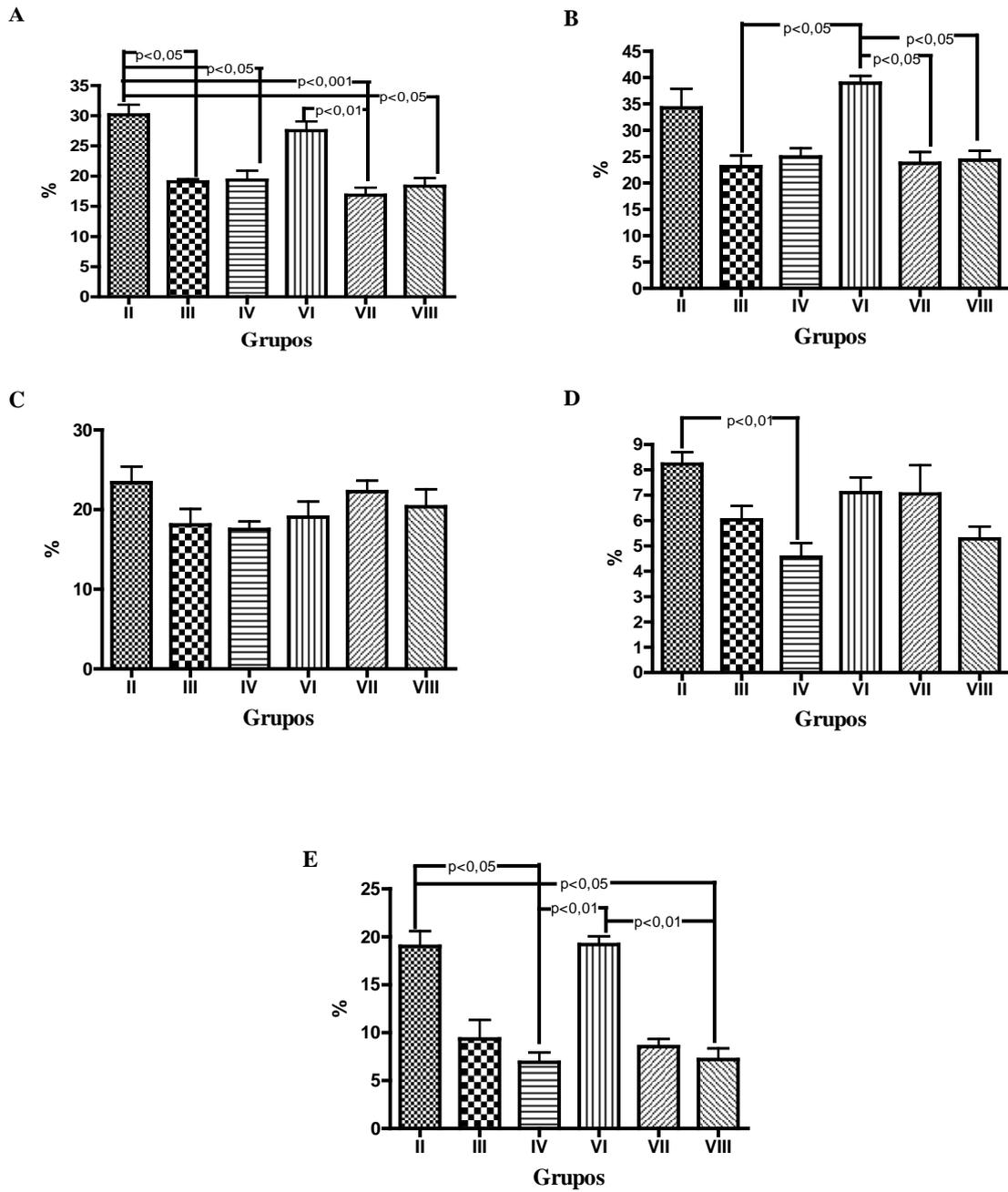


Fig. 9. Comparação da contagem relativa de linfócitos T (A), T- CD4 (B), T- CD8 α (C), T- CD8 β (D) e linfócitos B de zona marginal do baço (E) na suspensão de células de baços e de auto-implantes esplênicos recuperados nas 6.^a e 12.^a semanas do experimento.

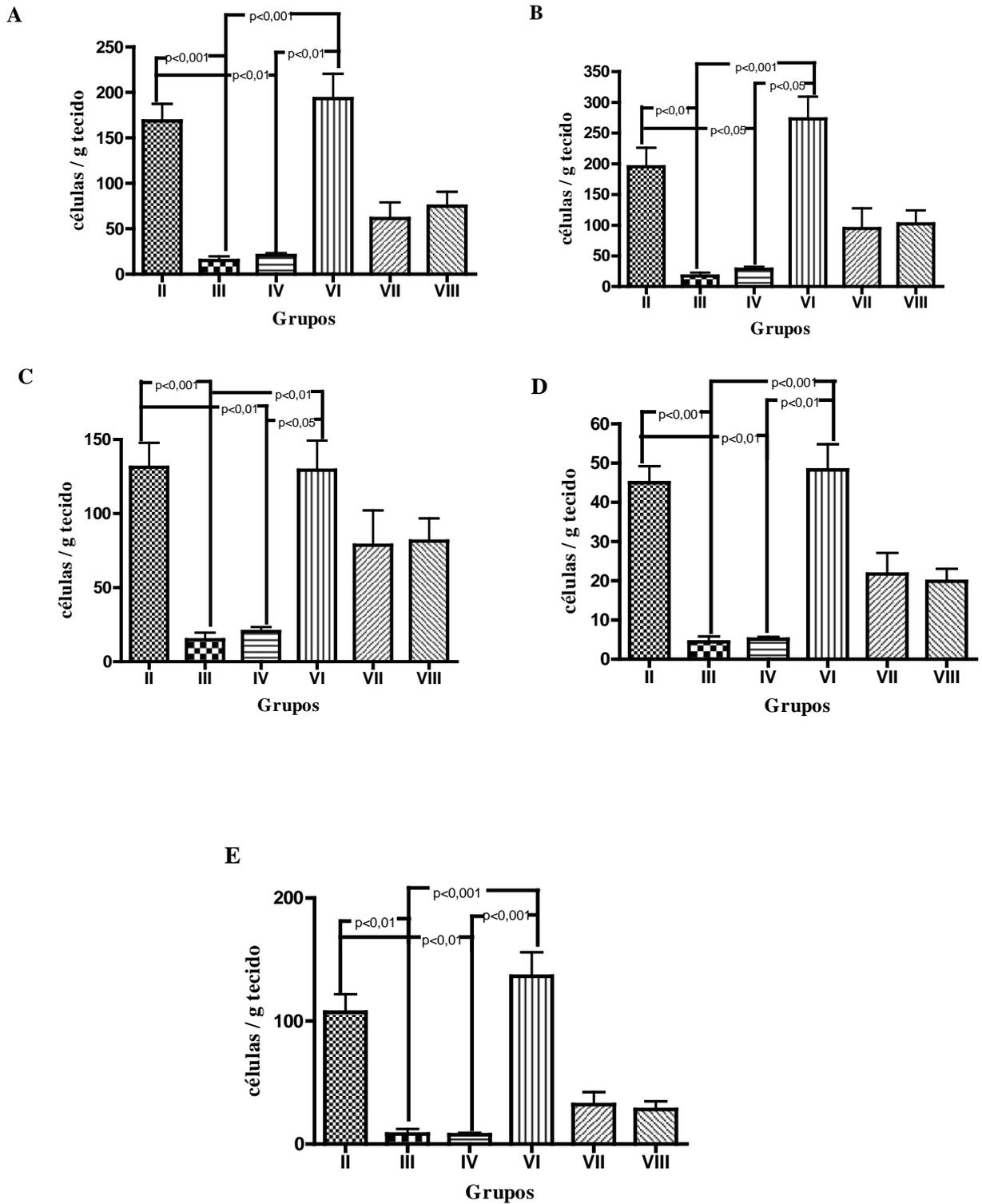


Fig. 10. Comparação da contagem absoluta (células / g tecido) de linfócitos T (A), T- CD4 (B), T- CD8 α (C), T- CD8 β (D) e linfócitos B de zona marginal do baço (E) na suspensão de células de baços e de auto-implantes esplênicos recuperados nas 6.^a e 12.^a semanas do experimento.

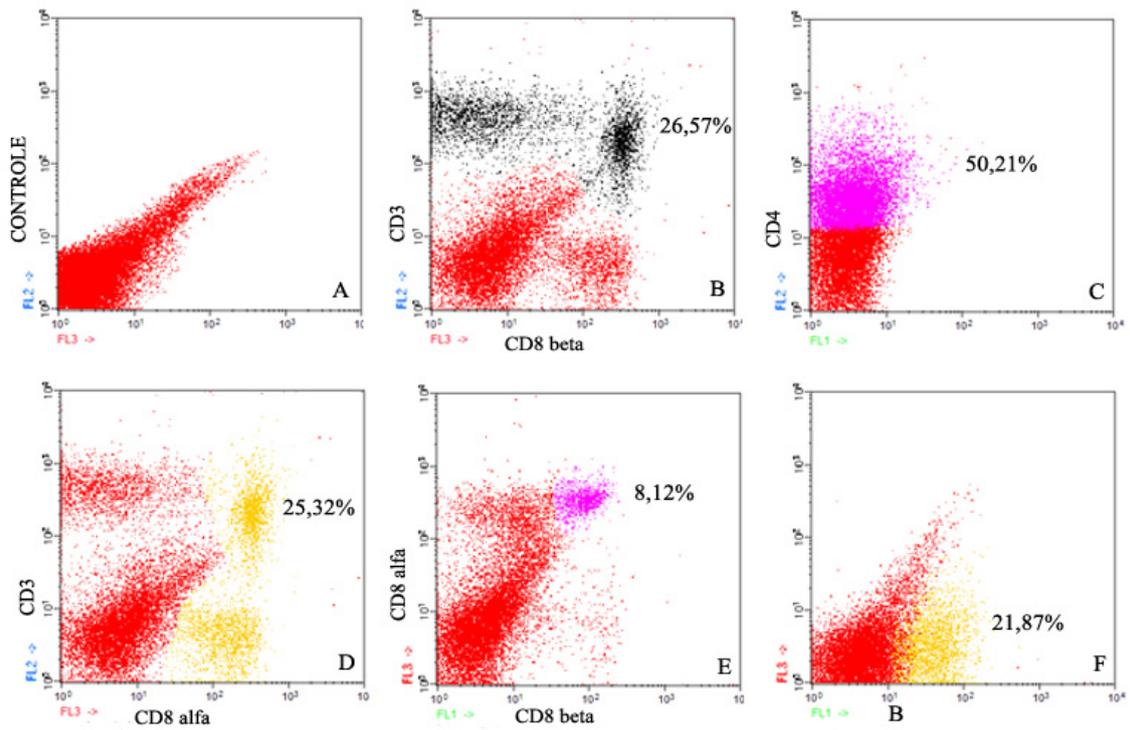


Fig. 11. Representação, em *dot plots*, da marcação por imunofenotipagem dos tipos celulares analisados nos baços e nos auto-implantes esplênicos, detectados por imunofenotipagem: A – controle; B – células T- CD3; C – células T- CD4; D – células T- CD8 α ; E – células T- CD8 β ; F – células B de zona marginal do baço.

5 – DISCUSSÃO

Com o reconhecimento de sérias complicações que podem advir na resposta imune após esplenectomia total (ET), levando ao aumento do risco da ocorrência de IFPE, [16-19,28,31,33-38,40,44,47,54,58,59,63,70,77-80, 111] diversas alternativas têm sido utilizadas no tratamento da lesão esplênica por trauma abdominal, como conduta conservadora não cirúrgica, esplenectomia parcial e subtotal, esplenorrafia, ligaduras arteriais e aplicação de agentes hemostáticos, entre outras.[55,59-64,112-121] Similarmente, o comportamento frente a muitas enfermidades que, até há pouco tempo, eram tratadas ou mesmo diagnosticadas e estadiadas com a remoção do baço, vem sofrendo grandes modificações.[18,70,122,123] Porém, existem situações em que a ET é inevitável [65-69] e, nesses casos, o auto-implante esplênico (AIE) pode se constituir em alternativa viável, visando à preservação das funções do órgão.[42,59,72,80,124-129]

A realização de AIE é tecnicamente simples e apresenta baixo índice de complicações,[31,42,67,80,125,126] sendo que, após período de tempo necessário para a sua regeneração, apresenta estrutura histológica semelhante a um baço normal.[130-134]

Existe grande diversidade de técnicas descritas para a realização de AIE, variando quanto à quantidade e ao formato do tecido, bem como ao local de implantação. Parece existir consenso de que se deve utilizar ao menos 25% da massa total do baço – massa crítica – para que se observe regeneração funcional.[30,129,135,136] No que se refere ao formato do tecido implantado, são utilizados a pulverização de tecido fragmentado na cavidade abdominal,[137] pequenos ou grandes segmentos, sob a forma de cubos [52,80,126] ou fatias [31,42,67,80,129], entre outros. Dentre os locais para implante, os mais frequentemente relatados são: tecido subcutâneo, fascia do músculo reto abdominal, retroperitônio e omento maior.[75] Entretanto, parece haver concordância entre a maioria dos

autores de que o implante de fatias esplênicas no omento maior leva a melhores resultados, morfológicos e funcionais, possivelmente pela manutenção da drenagem venosa para o sistema porta, em similaridade ao que ocorre no baço *in situ*. [31,42,75,136]

Neste estudo, utilizou-se um modelo experimental em que toda a massa esplênica de cada um dos animais foi dividida em cinco fatias aproximadamente iguais e suturadas no omento maior, interpondo-se tecido omental entre as fatias, no intuito de favorecer a revascularização tecidual e a drenagem venosa. [62,133-144]

Os dados da literatura são bastante controversos acerca do tempo necessário para que ocorra a regeneração morfológica do implante esplênico autógeno em ratos, variando entre cinco [145] e oito semanas. [136] Neste estudo, decorridas seis (grupos IV e VIII) e 12 (grupos III e VII) semanas do início do experimento, todos os implantes apresentaram regeneração morfológica, com presença de polpas vermelha e branca, e folículos linfóides, apesar da maior congestão vascular e maior desarranjo da arquitetura tecidual observada nos auto-implantes analisados com seis semanas.

A massa de tecido esplênico necessária para gerar função esplênica é dependente da quantidade de tecido regenerada. [146] Não existiu diferença no percentual de massa regenerada em relação à massa esplênica implantada, em todos os grupos de animais em que se realizou o AIE, independentemente se a retirada desses implantes ocorreu com seis ou 12 semanas. Contudo, a regeneração funcional relaciona-se também com o tempo decorrido após o implante, ocorrendo mais tardiamente que a regeneração morfológica. [74,136,138,147,148]

Recentemente, foi mostrado que, a partir de oito semanas, passa a não existir diferença entre grupos de ratos com AIE (com implante de toda a massa esplênica, dividida em cinco fatias) e animais saudáveis (grupo

controle), no tocante à depuração de corpúsculos de HJ do sangue periférico, evidenciando o início da regeneração funcional a partir desse período. (Marques *et al.*, dados não publicados) A partir deste estudo, optou-se por realizar o acompanhamento de animais submetidos a ET combinada com AIE em dois períodos, um anterior a oito semanas (seis semanas) e outro posterior (12 semanas).

Ao potencial de modulação da atividade do sistema imune pela intervenção dietética com nutrientes específicos, denomina-se imunonutrição, sendo o aminoácido L-glutamina (GLN) usualmente incluído na lista dos imunonutrientes.[95,149-151] A GLN é o aminoácido mais abundante no plasma e no músculo, apresentando ações específicas no pulmão, coração, fígado, trato digestório, rim e sistema imune.[152,153] As células do sistema imune possuem a enzima glutaminase e utilizam alta taxa de GLN, haja vista que este aminoácido é utilizado como fonte energética para neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Ademais, a GLN é importante para aumentar a síntese de proteínas de fase aguda, manter a secreção apropriada de citocinas e atenuar a resposta de citocinas pró-inflamatórias após endotoxemia.[88-98,153]

É limitado o número de estudos em que foi avaliada a ação da suplementação dietética de GLN nas células do sistema imune. Em sua maioria, os estudos sobre o efeito dessa suplementação são realizados *in vitro*. [82,83,102,154,155] Em geral, a concentração utilizada desse aminoácido nos meios de cultura é de 2 mM/l, mas alguns autores utilizam diferentes concentrações, maiores e menores.[82,83,102,154,155]

Kew *et al.* (1999), estudando a proliferação linfocitária em baços de camundongos, observaram melhor resposta com a utilização de dieta oral que continha quantidade de GLN, aproximadamente, 150% maior que a dieta controle [156]; Yeh *et al.* (2004, 2005) utilizaram, em ratos submetidos a indução de peritonite, dieta parenteral enriquecida com GLN

na quantidade equivalente a 25% da concentração total de nitrogênio na dieta e observaram melhor atividade fagocitária de macrófagos e maior secreção de citocinas por linfócitos T_{h1} e T_{h2} ;[157,158] e Yoo *et al.* (1997) utilizaram, em porcos submetidos a inoculação intravenosa de *Escherichia coli*, dieta enteral suplementada contendo 40 g/kg de GLN, verificando normalização da função linfocitária, sob estímulo mitogênico.[159]

Adicionalmente, estudos sobre outros aspectos funcionais da suplementação dietética com GLN, realizados em ratos ou camundongos, como manutenção da barreira intestinal, cicatrização de anastomoses e minimização dos efeitos da irradiação abdominal, foram realizados com diferentes dosagens, em relação ao peso corporal do animal, como 0,5 g/kg [160] ou 1 g/kg [161,162,163], 2% do peso da dieta[164] e 3% da água ofertada.[165] Observa-se, assim, que diferentes concentrações e dosagens têm sido utilizadas para a suplementação com GLN, dificultando, sobremaneira, a padronização e a comparação dos resultados. Optou-se pela suplementação de GLN com uma dosagem que, desde 2004, vem sendo utilizada em uma linha de pesquisa em desenvolvimento no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro – 1g/kg/dia.[167,168]

Também em humanos, não existe padronização de dose diária de GLN. Em pacientes com doença crítica, câncer em tratamento com radioterapia ou submetidos a transplante de medula óssea, ela é habitualmente utilizada na dose de 0,3 a 0,57 g/kg/dia.[158]

Devido ao risco aumentado do surgimento de infecções, em geral, e da ocorrência de IFPE [16-19,28,31,33-38,40,44,47,54,58,59,63,70,77-80, 111], diversas estratégias preventivas, como educação do paciente, imunização e antibioticoprofilaxia, são recomendadas para pacientes submetidos a ET isolada [55,166-168] ou, fundamentado no conhecimento existente, mesmo combinada com AIE, haja vista que, mesmo com a sua

realização, continuam a existir controvérsias acerca da efetiva regeneração das funções do baço.[169,170] Pacientes asplênicos e com disfunção esplênica, bem como profissionais da área da saúde, devem estar conscientes da necessidade de adoção de condutas especiais, frente à realização de procedimentos cirúrgicos, instrumentações e tratamentos dentários.[166]

O uso da suplementação dietética com imunonutrientes, como GLN, encontra justificativa em pacientes em que se deseja modificar ou implementar a resposta inflamatória e imune. Entretanto, a imunonutrição tem sido mais freqüentemente utilizada em períodos pré e/ou pós-operatórios, com o objetivo de diminuir o risco de complicações infecciosas em pacientes cirúrgicos, com baço intacto ou não.[171] Esses estudos motivaram a utilização da suplementação dietética com GLN nos 15 dias que antecederam a avaliação (D0, seis e 12 semanas), em todos os grupos de animais, com a finalidade de se determinar a existência de alterações nas subpopulações linfocitárias após ET isolada ou combinada com AIE,[16,17,77,172,173] em similaridade a *Kew et al.* (1999), que a utilizaram em camundongos por 15 dias,[156] e *Yeh et al.* (2004, 2005) que, precedendo a indução de sepse em ratos, instituíram o seu emprego em nutrição parenteral por 10 dias.[157,158]

Já há muito, sabe-se que pacientes esplenectomizados cursam com leucocitose, o que não indica, necessariamente, a presença de infecção. [8,33,45,174-177] *Djaldetti et al.* (2003) e *Bessler et al.* (2004) observaram que camundongos submetidos a ET isolada apresentaram aumento progressivo da contagem total de leucócitos e de linfócitos significativamente maior em comparação a animais-controle (com baço intacto), até oito semanas após o procedimento.[174,178] *Bessler et al.* (2004), utilizando um grupo adicional de animais submetidos a esplenectomia parcial, verificaram que, quando ao menos 30% da massa

esplênica é preservada, essa alteração não ocorre.[174] Miko *et al.* (2006) determinaram a contagem leucocitária total em três grupos de camundongos: não operados, submetidos a ET isolada e a ET combinada com AIE (10% da massa esplênica). Com seis e oito semanas, não havia diferença entre esses grupos, mas, aos seis meses, os animais operados apresentaram contagem significativamente acima da encontrada em animais não operados.[77]

Ainda não está bem compreendido como o baço regularia a contagem periférica de leucócitos, mas algumas hipóteses são propostas. Poderia ser coerente admitir a possibilidade que o baço inibe a produção de células sanguíneas pela medula óssea, ao mesmo tempo em que ocorre aumento da destruição esplênica de células,[178] mas este mecanismo já foi questionado, há muito.[179] Djaldetti *et al.* (2003) discutem outras possibilidades: a existência de fatores liberados pelo baço que poderiam afetar a divisão celular e a resposta mitogênica; a produção esplênica de fatores humorais, regulando a migração celular dos tecidos e cavidades do corpo para a corrente sanguínea; e a mediação esplênica, ainda que parcial, na morte celular programada (apoptose).[178] Esses autores observaram que camundongos submetidos a ET apresentaram leucocitose associada a diminuição do número de células apoptóticas no sangue periférico e de células brancas na cavidade peritoneal.[178] Existe uma recirculação contínua de células linfóides maduras do sangue para os órgãos linfóides e, através de vasos linfáticos esplênicos eferentes, migração para os nódulos linfáticos, com posterior retorno ao sangue.[1] Após a realização de ET, poderia ocorrer uma alteração no balanço existente entre o número dessas células nos tecidos e no sangue periférico, resultando em migração celular dos tecidos e das cavidades para a corrente sanguínea.[178]

Apesar da ausência de diferença nas variáveis analisadas na série branca do hemograma, entre todos os grupos de ratos, ao observar-se o

comportamento dos animais, ao início e ao término do experimento, ocorreu aumento do número de leucócitos e de linfócitos nos animais submetidos a ET isolada (grupos II e VI) ou combinada com AIE, independentemente se às seis ou 12 semanas, (grupos III, IV, VII e VIII), e não nos grupos-controle (I e V). Wolf *et al.* (1999) e Resende & Petroianu (2001, 2002), em estudos com humanos, não relataram diferença na contagem total de leucócitos e de linfócitos em pacientes submetidos a ET isolada, em comparação a indivíduos saudáveis.[48,125,180] Estes últimos autores também avaliaram pacientes submetidos a ET combinada com AIE, chegando ao mesmo resultado.[48,125]

No que tange à contagem absoluta de linfócitos periféricos, Sipka *et al.* (2006) mostraram que, aos dois meses, não existiu diferença entre camundongos submetidos a ET isolada ou combinada com AIE no omento maior (10% a 15% da massa esplênica) e controles (saudáveis), mas, aos oito meses, essa contagem diminuiu significativamente nos animais submetidos a ET isolada, em relação aos controles, o que não se observou naqueles submetidos a AIE.[17]

Existe grande controvérsia na literatura acerca da alteração no número de células B após a realização de ET. Neste estudo, não observou-se diferença na subpopulação de linfócitos B de ZMB no sangue periférico, entre todos os grupos de animais. Em similaridade, Büyükcinal *et al.* (1987), Corazza *et al.* (1990), Tsai *et al.* (1991) e Wolf *et al.* (1999) não observaram diferença na subpopulação de linfócitos B em pacientes esplenectomizados.[80,172,173,180] Em contraposição, diversos outros autores observaram, após ET, além de aumento marcante na quantidade total de linfócitos, aumento da subpopulação de linfócitos B periféricos, tanto em pacientes [47,52,125,181-186] quanto em ratos,[187] o que possivelmente pode ser justificado pelo acúmulo dessas células no compartimento sanguíneo, na ausência de baço.[188,189] Contudo, mesmo

com a realização de AIE, continua a existir aumento no número dessas células no sangue.[125,181,186,187]

Milicevic *et al.* (2001) encontraram aumento do número em todas as subpopulações de linfócitos B no sangue periférico de ratos esplenectomizados: fundamentais – *näive* (IgD^+IgM^+), com memória ($\text{IgD}^-\text{IgM}^{\text{high}}$), recentemente formados ($\text{IgM}^{\text{low}}\text{CD90}^{\text{high}}$), foliculares recirculantes precoces ($\text{IgM}^{\text{low}}\text{CD90}^{\text{high}}$), foliculares recirculantes ($\text{IgM}^{\text{high}}\text{CD90}^-$) e de ZMB ($\text{IgM}^{\text{high}}\text{CD90}$).[190] Ademais, esses linfócitos B apresentaram significativa redução na expressão de antígeno 1 associado à função linfocitária (LFA1) e ICAM-1, que induz a ocorrência de migração celular mais rápida através dos linfonodos, podendo contribuir para o seu aumento no sangue.[190]

Inversamente, parece existir diminuição na contagem relativa da subpopulação de linfócitos T em pacientes submetidos a ET isolada, [47,52,180,191] ratificando nossos resultados. Entretanto, não há uniformidade nesse relato, haja vista a ausência de diferença observada por alguns autores na contagem relativa de linfócitos T periféricos em pacientes submetidos a ET isolada [195] ou mesmo combinada com AIE.[172]

Em animais submetidos a ET combinada com AIE, tanto com seis quanto com 12 semanas, não observou-se diminuição do percentual de linfócitos T periféricos, podendo, eventualmente, sugerir que a presença de AIE regenerado minimizou essa ocorrência, em contraposição ao que foi verificado por Sipka *et al.*[17] Possivelmente, o resultado observado por estes autores deve-se ao emprego de apenas 10% a 15% da massa esplênica original, percentual inferior ao que é considerado como mínimo (massa crítica) para o desenvolvimento da regeneração funcional do implante esplênico autógeno.[30,128,129,135,136] A contagem absoluta desse mesmo subtipo celular (linfócitos T) não apresentou diferença nos animais

submetidos a ET isolada, em concordância com o relato em diversos estudos em humanos,[47,52,180,191] e naqueles submetidos a ET combinada com AIE.

No tocante às subpopulações de linfócitos T- CD8⁺ e T- CD4⁺, também existe grande controvérsia. Diversos autores, ao observarem pacientes esplenectomizados, verificaram aumento significativo na contagem absoluta da subpopulação de linfócitos T- CD8⁺ séricos. [181,182,186,192] Similarmente, isto também foi observado em ratos submetidos a ET isolada ou combinada com AIE após 15 meses do procedimento, em comparação a controles.[187]

Em pacientes saudáveis esplenectomizados, existe ativação de células T e produção de citocinas, levando à produção de mais células T, especialmente T- CD8⁺, o que resulta na produção aumentada de citocinas tipo 1, como IFN- γ , e ativação de componentes celulares da imunidade inata.[47,191] Este achado ratifica a observação de outros autores que mostram elevação da atividade citotóxica de células NK e ativação de monócitos em indivíduos esplenectomizados,[192-194] que compensariam, ao menos em parte, a perda da atividade fagocitária do baço. Por outro lado, essas alterações podem prejudicar a função linfocitária [47] e a resposta de anticorpos [195] nesses pacientes, haja vista o aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (tipo 1), o que pode contribuir para o aumento da sua suscetibilidade a infecções por bactérias encapsuladas.[191]

Observou-se que a contagem absoluta da subpopulação de linfócitos T- CD8 α e T- CD8 β , no sangue periférico de animais esplenectomizados, permaneceu inalterada, em comparação aos grupos-controle. Resultados similares também foram observados por outros autores, no que se refere à contagem relativa [173,180] e absoluta de linfócitos T- CD8⁺, em pacientes esplenectomizados. Especificamente, em relação à contagem relativa de

linfócitos T- CD8 β , observou-se diminuição em comparação ao grupo de animais-controle suplementados com GLN (grupo V).

No que tange às células T- CD4⁺, diversos estudos mostraram diminuição significativa em sua contagem relativa após a realização de ET em humanos.[47,67,173,180,191,192,196] Ademais, Pachter & Grau (2000) relataram que a proporção de linfócitos T- CD4⁺/T- CD8⁺ (*helper/supressor*) e a própria competência, em geral, dos linfócitos T, encontra-se reduzida após ET, o que pode se dever à diminuição da responsividade mitogênica dos linfócitos,[67] já previamente observado por outros autores.[52,184,195,197]

Ocorreu diminuição significativa do percentual de linfócitos T- CD4⁺ nos animais esplenectomizados sem suplementação de GLN (grupo II) em relação aos controles (grupos I e V). A GLN parece ter exercido efeito benéfico na contagem relativa e absoluta da subpopulação de linfócitos T- CD4⁺ em ratos submetidos a ET combinada com AIE, independentemente se a recuperação dos implantes regenerados deu-se às seis ou 12 semanas, em comparação aos animais do grupo II (ET isolada, sem suplementação). Este resultado pode sugerir que, ambos, tanto a realização de AIE quanto a suplementação de GLN, podem ter contribuído para minimizar a diminuição do percentual de linfócitos T- CD4⁺ no sangue periférico, que usualmente ocorre após a realização de ET.

A grande maioria dos linfócitos encontra-se em estado inativo e é ativado somente quando existe algum tipo de interação antigênica, que é necessária tanto para a ativação quanto para a proliferação linfocitária,[23] momento no qual eleva-se a concentração de glutaminase na célula, tornando de especial importância o aporte de GLN.[101-104] Porém, em animais normais e não submetidos a estímulos imunes, mesmo em linfócitos em estado latente, que constituem a maioria dessas células, observa-se alta taxa de utilização de GLN.[94,198,199]

Com o objetivo de caracterizar as subpopulações linfocitárias no tecido esplênico normal e regenerado, também realizou-se contagem de células brancas e análise por citometria de fluxo de suspensões celulares obtidas a partir dos baços dos animais dos grupos II e IV e dos AIE recuperados nas 6.^a (grupos IV e VIII) e 12.^a (grupos III e VII) semanas. A compreensão da constituição celular no tecido regenerado pode auxiliar no entendimento da regeneração da função imunológica de AIE.

Verificou-se menor número de células brancas por grama de tecido nos AIE recuperados tanto na 6.^a (grupo IV) quanto na 12.^a semana (grupo III) dos animais que não receberam suplementação de GLN, em comparação ao observado nos baços dos animais esplenectomizados (grupos II e VI). Esta também foi a constatação de Smith *et al.* (1999), após seis a nove meses de regeneração de AIE realizados em ratos, com 25% da massa esplênica original suturada no mesentério do íleo terminal.[200] Entretanto, a GLN parece ter levado a maior proliferação dessas células nos AIE (grupos VII e VIII), haja vista a ausência de diferença entre os animais desses grupos e aqueles dos grupos II e VI (ET isolada, sem e com suplementação de GLN, respectivamente).

No que concerne às subpopulações linfocitárias, observou-se diminuição significativa da contagem relativa de linfócitos T nos AIE (grupos III, IV, VII e VIII) comparando-os aos baços (grupos II e VI), independentemente da suplementação de GLN. Contudo, a suplementação com GLN propiciou maior proliferação de linfócitos T- CD8 β , haja vista que AIE recuperados na 6.^a semana, em animais não suplementados com esse aminoácido, mostraram diminuição no número dessas células, em comparação aos baços dos animais do grupo II (ET isolada), o que não foi observado nos AIE de animais suplementados (grupos VIII).

A contagem absoluta das subpopulações de células T foi realizada a partir dos percentuais obtidos por citometria de fluxo, em função do

número de células / g de tecido. O número de linfócitos T, T- CD4, T- CD8 α e T-CD8 apresentou-se diminuído nos AIE dos animais que não receberam suplementação de GLN (grupos III e IV), em comparação aos baços (grupos II e VI). Como a GLN levou a aumento do número de células brancas nos AIE dos animais dos grupos VII e VIII, não observou-se diferença nessas mesmas subpopulações linfocitárias, em comparação aos baços (grupos II e VI).

A diminuição das contagens absoluta e relativa de subpopulações de linfócitos T, T- CD4⁺ e T- CD8⁺ em comparação a baços de animais esplenectomizados também foi observada por Smith *et al.* (1999), após seis a nove meses de implantação,[200] e por Westermann & Pabst (1985), após 17, 24 e 37 semanas.[189] Alguns autores sugerem que a regeneração morfológica do AIE pode não ser completa, com diminuição do número de artérias centrais e do volume da BLPA, associado a aumento do tecido fibroso,[201,202] o que poderia contribuir para a diminuição do número de células brancas por grama de tecido e do percentual de linfócitos T.[202]

Poucos autores estudaram o número de linfócitos B e, ainda assim, há controvérsia nos relatos, mostrando contagem absoluta diminuída e contagem percentual inalterada [200] ou aumentada, em AIE em comparação com baços normais.[189] Observou-se que AIE recuperados na 12.^a semana, mas não na 6.^a semana, independentemente da suplementação de GLN, não apresentaram diferença no tocante ao percentual de linfócitos B de ZMB em comparação aos baços, sugerindo a existência de regeneração funcional mais completa nesse momento. Antígenos de bactérias que possuem capa de polissacarídeos elicitam resposta imune que independe de células T, mas não de células B de ZMB, e essa resposta pode ainda não estar adequada com apenas seis semanas da realização de AIE.[204,205] Contudo, ao avaliar-se a contagem absoluta de linfócitos B de ZMB, verificou-se que, da mesma forma que ocorreu com

as subpopulações de linfócitos T, uma maior contagem de células foi observada nos AIE de animais suplementados com GLN (grupos VII e VIII), determinando ausência de diferença deste subtipo celular em comparação aos baços (grupos II e VI), o que não ocorreu com os AIE de animais não suplementados.

Em resumo, fundamentado nos resultados encontrados nesta pesquisa, verificou-se que:

- a esplenectomia total isolada acarretou diminuição da contagem relativa de linfócitos T totais e T- CD4 no sangue, mas a suplementação dietética com L-glutamina evitou a diminuição do percentual de células T- CD4;
- o auto-implante esplênico, após 12 semanas de experimento, propiciou a manutenção da contagem relativa de linfócitos T totais e T- CD4 no sangue, e dentre esses animais, aqueles que receberam suplementação dietética com L-glutamina, apresentaram contagens relativas de linfócitos T- CD4 maiores que animais esplenectomizados sem suplementação;
- o auto-implante esplênico, após seis semanas de experimento, associado à suplementação dietética com L-glutamina, ocasionou contagens absoluta e relativa de linfócitos T- CD4 no sangue significativamente maiores que em animais submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, com o mesmo tempo de avaliação, mas sem suplementação dietética;
- a suplementação dietética com L-glutamina manteve o número de células brancas / g de tecido nos auto-implantes esplênicos, em comparação ao encontrado nos baços de animais saudáveis;
- após período de regeneração de 12 semanas, os auto-implantes esplênicos apresentaram contagem relativa de linfócitos B de zona marginal do baço semelhante à encontrada nos baços de animais

saudáveis, o que não ocorreu com período de regeneração de seis semanas.

A realização do auto-implante esplênico parece minorar a deficiência do sistema imune observada na asplenia, mas, até o momento, ainda não existem evidências suficientes de que este procedimento pode suprir inteiramente a ausência do baço. Em similaridade, a imunomodulação com L-glutamina parece representar uma boa opção no preparo pré-operatório em situações associadas a risco aumentado do desenvolvimento de infecções, como ocorre na asplenia. A eventual sinergia entre a realização de auto-implante esplênico após esplenectomia total e a suplementação dietética com L-glutamina, em animais de experimentação, assim como em indivíduos, ainda demanda novos estudos, mas estes resultados preliminares apontam para uma ampliação benéfica da regeneração da resposta imune com a sua utilização.

A continuação desta linha de pesquisa faz-se necessária, no intuito de complementar os dados apresentados, com avaliação em períodos mais tardios após a realização de esplenectomia total isolada ou combinada com auto-implante esplênico, empregando diferentes dosagens e períodos de suplementação dietética de L-glutamina e utilizando fatores para estimulação mitogênica destas e de outras subpopulações linfocitárias.

6 – CONCLUSÃO

O auto-implante esplênico em ratos, após esplenectomia total, associado à suplementação dietética com L-glutamina, foi capaz de reverter alterações observadas em algumas das subpopulações linfocitárias, ocasionadas pela esplenectomia.

7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Cesta MF. Normal structure, function and histology of the spleen. *Toxicol Pathol* 2006; 34:455-65.
2. Chadburn A. The spleen: anatomy and anatomical function. *Semin Hematol* 2000; 37:13-21.
3. Skandalakis PN, Colborn GL, Skandalakis LJ, Richardson DD, Mitchell WE Jr, Skandalakis JE. The surgical anatomy of the spleen. *Surg Clin North Am* 1993; 73:747-68.
4. Hazlewood M, Kumararatne DS. The spleen? Who needs it anyway? *Clin Exp Immunol* 1992; 89:327-9.
5. Brendolan A, Rosado MM, Carsetti R, Selleri L, Dear TN. Development and function of the mammalian spleen. *BioEssays* 2007; 29:166-77.
6. Antunes LJ: Generalidades sobre Imunologia e Baço. In: Petroianu A (ed.), *O Baço*. São Paulo: CRL Balieiro Editores Ltda. 2003; p. 43-8.
7. Matsuno K, Ezaki T, Kotani M. Splenic outer periarterial lymphoid sheath (PALS): an immunoproliferative microenvironment constituted by antigen-laden marginal metallophils and ED2-positive macrophages in the rat. *Cell Tissue Res* 1989; 257:459-70.
8. Eichner ER. Splenic function: normal, too much and too little. *Am J Med* 1979; 66:311-20.
9. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 2005; 5:606-16.
10. Oliver AM, Martin F, Gartland GL, Carter RH, Kearney JF. Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur J Immunol* 1997; 27:2366-74.
11. Mebius RE, Nolte MA, Kraal G: Development and function of the splenic marginal zone. *Crit Rev Immunol* 2004; 24:449-64.

12. Martin F, Oliver AM, Kearney JF. Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens. *Immunity* 2001; 14:617-29.
13. Nolte MA, Arens R, Kraus M, van Oers MH, Kraal G, van Lier RA *et al.* B cells are crucial for both development and maintenance of the splenic marginal zone. *J Immunol* 2004; 172:3620-7.
14. Kelemen E, Gergely P, Lehoczky J, Triska E, Demeter J, Vargha P. Permanent large granular lymphocytosis in the blood of splenectomized individuals without increase in vitro natural killer cell cytotoxicity. *Clin Exp Immunol* 1986; 63:696-702.
15. Lima AS, Pimenta LG. Visão crítica dos métodos de tratamento do trauma esplênico. *São Paulo Med J* 1987; 105:226-34.
16. Sipka S Jr., Brath E, Toth FF, Fabian A, Krizsan C, Barath S *et al.* Distribution of peripheral blood cells in mice after splenectomy or autotransplantation. *Microsurgery* 2006; 26:43-9.
17. Sipka S Jr., Bráth E, Tóth FF, Aleksza M, Kulcsár A, Fabian A *et al.* Cellular and serological changes in the peripheral blood of splenectomized and spleen autotransplanted mice. *Transpl Immunol* 2006; 16:99-104.
18. Lynch AM, Kapila R. Overwhelming postsplenectomy infection. *Infect Dis Clin North Am* 1996; 10:693-707.
19. Altamura M, Caradonna L, Amati L, Pellegrino NM, Urgesi G, Miniello S. Splenectomy and sepsis: the role of the spleen in the immune-mediated bacterial clearance. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2001; 23:153-61.
20. Souza JCL, Athiê E, Marigo C, Rahal F, Fagundes DJ. Estudo da regeneração esplênica autóloga e heterotópica em ratos. *Acta Cir Bras* 2005; 20:253-7.

21. Delves PJ, Roitt IM. The immune system – first of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343:37-49.
22. Fleisher TA, Bleesing JJ. Immune function. *Pediatr Clin North Am* 2000; 47:1197-209.
23. Lanier LL. The origin and functions of natural killer cells. *Clin Immunol* 1999; 95(1 Pt 2):S14-8.
24. Jiang H, Chess L. How the immune system achieves self-nonsel self discrimination during adaptive immunity. *Adv Immunol* 2009; 102:95-133.
25. Delves PJ, Roitt IM. The immune system – second of two parts. *N Engl J Med* 2000; 343:108-17.
26. Gangadharan D, Cheroutre H. The CD8 isoform CD8alphaalpha is not a functional homologue of the TCR co-receptor CD8alphabeta. *Curr Opin Immunol* 2004; 16:264-70.
27. Grunig G, Corry DB, Leach MW, Seymour BW, Kurup VP, Rennick DM. Interleukin-10 is a natural suppressor of cytokine production and inflammation in murine model of allergic bronchopulmonary aspergillosis. *J Exp Med* 1997; 185:1089-99.
28. Krivit W, Giebink GS, Leonard A. Overwhelming postplenectomy infection. *Surg Clin North Am* 1979; 59:223-33.
29. Rose AT, Newman MI, Debelak J, Pinson CW, Morris JA Jr, Harley DD *et al*. The incidence of splenectomy is decreasing: lessons learned from trauma experience. *Am Surg* 2000; 66:481-6.
30. Pisters PW, Pachter HL. Autologous splenic transplantation for splenic trauma. *Ann Surg* 1994; 219:225-35.
31. Timens W, Leemans R. Splenic autotransplantation and the immune system. Adequate testing required for evaluation of effect. *Ann Surg* 1992; 215:256-60.

32. Paulo DN, Paulo ICAL, Kalil M, Vargas PM, Silva AL, Baptista JF *et al.* Subtotal splenectomy preserving the lower pole in rats: technical, morphological and functional aspects. *Acta Cir Bras* 2006; 21:321-7.
33. Morris DH, Bullock FD. The Importance of the spleen in resistance to infection. *Ann Surg* 1919; 70:513-21.
34. King H, Schumacker HB Jr. Splenic studies: 1. Susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. *Ann Surg* 1952; 136:239-42.
35. Horan M, Colebatch JH. Relationship between splenectomy and subsequent infection: a clinical study. *Arch Dis Child* 1962; 37:398-414.
36. Diamond LK. Splenectomy in childhood and the hazard of overwhelming infection. *Pediatrics* 1969; 43:886-9.
37. Singer DB. Postsplenectomy sepsis. *Perspect Pediatr Pathol* 1973; 1:285-311.
38. Bridgen ML, Pattullo AL. Prevention and management of overwhelming postesplenectomy infection: an update. *Crit Care Med* 1999; 27:836-42.
39. Styrt B. Infection associated with asplenia: risks, mechanisms and prevention. *Am J Med* 1990; 88(5N):33N-42N.
40. Bohnsack JF, Brown EJ. The role of the spleen in resistance to infection. *Annu Rev Med* 1986; 37:49-59.
41. Brown EJ, Hosea SW, Frank MM. The role of the spleen in experimental pneumococcal bacteremia. *J Clin Invest* 1981; 67:975-82.
42. Patel J, Williams JS, Shmigel B, Hinshaw JR. Preservation of splenic function by autotransplantation of traumatized spleen in man. *Surgery* 1981; 90:683-8.

43. Yiong G, Han G, Xian-Tao K. Immunoglobulins and complement in splenectomized and autotransplanted subjects. *Ann Med* 1989; 21:265-7.
44. Trigg ME. Immune function of the spleen. *South Med J* 1979; 72:593-9.
45. Cooper MJ, Williamson RC. Splenectomy: indications, hazards and alternatives. *Br J Surg* 1984; 71:173-80.
46. Horowitz J, Leonard D, Smith J, Brotman S. Postsplenectomy leukocytosis: physiologic or an indicator of infection? *Am Surg* 1992; 58:387-90.
47. Ferrante A, Drew PA, Kiroff GK, Zola H. Peripheral blood leukocyte subpopulations in patients splenectomized for trauma. *Clin Exp Immunol* 1987; 70:158-63.
48. Resende V, Petroianu A, Junior WC. Autotransplantation for treatment of severe splenic lesions. *Emerg Radiol* 2002; 9:208-12.
49. Miko I, Brath E, Nemeth N, Toth FF, Sipka S, Kovacs J *et al.* Hematological, hemorheological, immunological, and morphological studies of spleen autotransplantation in mice: preliminary results. *Microsurgery* 2003; 23:483-8.
50. Nunes SI, Rezende AB, Teixeira FM, Ferreira AP, Alves MJ, Jamel N *et al.* Antibody response of autogenous splenic tissue implanted in the abdominal cavity of mice. *World J Surg* 2005; 29:1623-9.
51. Leemans R, Manson W, Snijder JA, Smit JW, Klasen HJ, The TH *et al.* Immune response capacity after human splenic autotransplantation: restoration of response to individual pneumococcal vaccine subtypes. *Ann Surg* 1999; 229:279-85.
52. Downey EC, Shackford SR, Fridlund PH, Ninnemann JL. Long-term depressed immune function in patients splenectomized for trauma. *J Trauma* 1987; 27:661-3.

53. Müftüoğlu TM, Köksal N, Özkutu D. Evaluation of phagocytic function of macrophages in rats after partial splenectomy. *J Am Coll Surg* 2000; 191:668-71.
54. Waghorn DJ. Overwhelming infection in aplenic patients: current best practice measures are not being followed. *J Clin Pathol* 2001; 54:214-8.
55. Brigden ML. Detection, education and management of the asplenic or hiposplenic patient. *Am Fam Physician* 2001; 63:499-506,508.
56. Hathaway JM, Harley RA, Self S, Schiffman G, Virella G. Immunological function in post-traumatic splenosis. *Clin Immunol Immunopathol* 1995; 74:143-50.
57. Llende M, Santiago-Delpín EA, Lavergne J. Immunobiological consequences of splenectomy: a review. *J Surg Res* 1986; 40:85-94.
58. Traub A, Giebink GS, Smith C, Kuni CC, Brekke ML, Edlund D *et al.* Splenic reticuloendothelial function after splenectomy, spleen repair and spleen autotransplantation. *N Engl J Med* 1987; 317:1559-64.
59. Feliciano DV, Bitondo CG, Mattox KL, Rumisek JD, Burch JM, Jordan GL Jr. A four-year experience with splenectomy versus splenorrhaphy. *Ann Surg* 1985; 201:568-75.
60. Morrell DG, Chang FC, Helmer SD. Changing trends in the management of splenic injury. *Am J Surg* 1995; 170:686-9; discussion 690.
61. Brasel KJ, DeLisle CM, Olson CJ, Borgstrom DC. Splenic injury: Trends in evaluation and management. *J Trauma* 1998; 44:283-6.
62. Marques RG, Petroianu A, de Oliveira MB, Bernardo-Filho M, Boasquevisque EM, Portela MC. Bacterial clearance after total splenectomy and splenic autotransplantation in rats. *Appl Radiat Isot* 2002; 57:767-71.

63. Christo MC, Didio LJ. Anatomical and surgical aspects of splenic segmentectomies. *Ann Anat* 1997; 179:461-74.
64. Buntain WL, Gould HR. Splenic trauma in children and techniques of splenic salvage. *World J Surg* 1985; 9:398-409.
65. Pachter HL, Guth AA, Hofstetter SR, Spencer FC. Changing patterns in the management of splenic trauma: the impact of nonoperative management. *Ann Surg* 1998; 227:708-17; discussion 717-9.
66. Millikan JS, Moore EE, Moore GE, Stevens RE. Alternative to splenectomy to adults after trauma. *Am J Surg* 1982; 144:711-6.
67. Pachter HL, Grau J. The current status of splenic preservation. *Adv Surg* 2000; 34:137-74.
68. Resende V, Petroianu A. Subtotal splenectomy for treatment of severe splenic injuries. *J Trauma* 1998; 44:933-5.
69. Sumaraju V, Smith LG, Smith SM. Infectious complications in asplenic hosts. *Infec Dis Clin North Am* 2001; 15:551-65.
70. Holdsworth RJ. Regeneration of the spleen and splenic autotransplantation. *Br J Surg* 1991; 78:270-8.
71. Buchbinder JH, Lipkoff CJ. Splenosis: multiple peritoneal splenic implants following abdominal injury. A report of a case and review of the literature. *Surgery* 1939; 6:927-34.
72. Liaunigg A, Kastberger C, Leitner W, Kurz ME, Bergmann ES, Seifriedsberger M *et al.* Regeneration of autotransplanted splenic tissue at different implantation sites. *Cell Tissue Res* 1992; 269:1-11.
73. Pabst R, Westermann J, Rothkötter HJ. Immunoarchitecture of regenerated splenic and lymph node transplants. *Int Rev Cytol* 1991; 128:215-60.
74. Tavassoli M, Ratzan RJ, Crosby WH. Studies on regeneration of heterotopic splenic autotransplants. *Blood* 1973; 41:701-9.

75. Patel JM, Williams JS, Naim JO, Hinshaw JR. The effect of site and technique of splenic tissue reimplantation on pneumococcal clearance from the blood. *J Pediatr Surg* 1986; 21:877-80.
76. Leemans R, Harms G, Rijkers GT, Timens W. Spleen autotransplantation provides restoration of functional splenic lymphoid compartments and improves the humoral immune response to pneumococcal polysaccharide vaccine. *Clin Exp Immunol* 1999; 117:596-604.
77. Miko I, Nemeth N, Sipka S, Jr., Brath E, Peto K, Gulyas A *et al.* Hemorheological follow-up after splenectomy and spleen autotransplantation in mice. *Microsurgery* 2006; 26:38-42.
78. Shennib H, Chiu RC, Mulder DS. The effects of splenectomy and splenic implantation on alveolar macrophage function. *J Trauma* 1983; 23:7-12.
79. Petroianu A, Simal CJR, Barbosa AJ: Assessment of phagocytic function in remnants of subtotal splenectomy and in autologous spleen implantation. *Med Sci Res.* 1993; 21: 175-7.
80. Büyükcünel C, Danismend N, Yeker D. Spleen-saving procedures in paediatric splenic trauma. *Br J Surg* 1987; 74:350-2.
81. Kew S, Wells SM, Yaqoob P, Wallace FA, Miles EA, Calder PC. Dietary glutamine enhances murine T-lymphocyte responsiveness. *J Nutr* 1999; 129:1524-31.
82. Rohde T, MacLean DA, Klarlund Pedersen B. Glutamine, lymphocyte proliferation and cytokine production. *Scand J Immunol* 1996; 44:648-50.
83. Yaqoob P, Calder PC. Glutamine requirement of proliferating T lymphocytes. *Nutrition* 1997; 13:646-51.
84. Lacey JM, Wilmore DW. Is glutamine a conditionally essential amino acid? *Nutr Rev* 1990; 48:297-309.

85. Souba WW, Smith RJ, Wilmore DW. Glutamine metabolism by the intestinal tract. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1985; 9:608-17.
86. Tapiero H, Mathe G, Couvreur P, Tew KD: II. Glutamine and glutamate. *Biomed Pharmacother.* 2002; 56: 446-57.
87. Ehrensvar G, Fischer A, Stjerholm R. Protein metabolism of tissue cells in vitro: the chemical nature of some obligate factors of tissue cell nutrition. *Acta Physiol Scand* 1949; 18:218-30.
88. Eagle H, Oyama VI, Levy M, Horton CL, Fleischman R. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. *J Biol Chem* 1956; 218:607-16.
89. Calder PC. Glutamine and the immune system. *Clin Nutr* 1994; 13:2-8.
90. Calder PC. Fuel utilization by cells of the immune system. *Proc Nutr Soc* 1995; 54:65-82.
91. Calder PC, Yagoob P. Glutamine and the immune system. *Amino Acids.* 1999; 17:227-41.
92. Newsholme P, Curi R, Pithon-Curi TC, Murphy CJ, Garcia C, Pires de Melo M. Glutamine metabolism by lymphocytes, macrophages and neutrophils: its importance in health and disease. *J Nutr Biochem* 1999; 10:316-24.
93. Newsholme P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, post-injury, surgery or infection? *J Nutr* 2001; 131(9 Suppl):2515S-22S; discussion 2523S-4S.
94. Wilmore D, Shabert JK. Role of glutamine in immunologic responses. *Nutrition* 1998; 14:618-26.
95. Curi R, Newsholme P, Pithon-Curi TC, Pires-de-Melo M, Garcia C, Homem-de-Bittencourt PI Jr *et al.* Metabolic fate of glutamine in lymphocytes, macrophages and neutrophils. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32:15-21.

96. Ardawi MS, Newsholme EA. Metabolism in lymphocytes and its importance in the immune response. *Essays Biochem* 1985; 21:1-44.
97. Ardawi MS. Glutamine and glucose metabolism in human peripheral lymphocytes. *Metabolism* 1988; 37:99-103.
98. Keast D, Newsholme EA. Effect of mitogens on the maximum activity of hexokinase, lactate dehydrogenase, citrate synthase and glutaminase in rat mesenteric lymph node, lymphocytes and splenocytes during the early period of culture. *Int J Biochem* 1990; 22:133-6.
99. Newsholme P, Curi R, Gordon S, Newsholme EA. Metabolism of glucose, glutamine, long chain fatty acids and ketone bodies by murine macrophages. *Biochem J* 1986; 239:121-5.
100. Curi TC, De Melo MP, De Azevedo RB, Zorn TM, Curi R. Glutamine utilization by rat neutrophils: presence of phosphate-dependent glutaminase. *Am J Physiol* 1997; 42(4 Pt 1):C1124-9.
101. Brand K. Glutamine and glucose metabolism during thymocyte proliferation. *Pathways of glutamine and glutamate metabolism. Biochem J* 1985; 228:353-61.
102. Ardawi MS, Newsholme EA. Glutamine metabolism in lymphocytes of the rat. *Biochem J* 1983; 212:835-42.
103. Brand K, Fekl W, von Hintzenstern J, Langer K, Luppia P, Schoerner C. Metabolism of glutamine in lymphocytes. *Metabolism* 1989; 38:29-33.
104. O'Rourke AM, Rider CC. Glucose, glutamine and ketone body utilisation by resting and concanavalin A activated rat splenic lymphocytes. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1010:342-5.
105. Gismondo MR, Drago L, Fassina MC, Vaghi I, Abbiati R, Grossi E. Immunostimulating effect of oral glutamine. *Dig Dis Sci.* 1998; 43:1752-4.

106. Sawyer DW, Donowitz GR, Mandell GL. Polymorphonuclear neutrophils: an effective antimicrobial force. *Rev Infect Dis* 1989; 11(Suppl 7):S1532-44.
107. Inoue Y, Grant JP, Snyder PJ. Effect of glutamine-supplemented intravenous nutrition on survival after *Escherichia coli*-induced peritonitis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1993; 17:41-6.
108. Suzuki Y, Matsumoto Y, Adjel AA, Osato L, Shinjo S, Yamamoto S. Effect of a glutamine-supplemented diet in response to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in mice. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 1993; 39:405-10.
109. Yoo SS, Field CJ, McBurney MI. Glutamine supplementation maintains intramuscular glutamine concentration and normalizes lymphocyte function in infected early weaned pigs. *J Nutr* 1997; 127:2253-9.
110. Marques RG, Morales MM, Petroianu A: Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cir Bras.* 2009; 24:69-74.
111. Baskurt OK. The role of spleen in suppressing the rheological alterations in circulating blood. *Clin Hemorheol Microc.* 1999; 20:181-8.
112. Clancy TV, Ramshaw DG, Maxwell JG, Covington DL, Churchill MP, Rutledge R et al. Management outcomes in splenic injury. *Ann Surg.* 1997; 226:17-24.
113. Resende V, Petroianu A. Esplenectomia subtotal no tratamento do trauma esplênico grave. *Rev Col Bras Cir.* 1997; 24:205-8.
114. Resende V, Petroianu A. Subtotal splenectomy for treatment of severe splenic injuries. *J Trauma.* 1998; 44:933-5.
115. Petroianu A, Silva RG, Simal CJR, Carvalho DG, Silva RAP. Late postoperative follow-up of patients submitted to subtotal splenectomy. *Am Surg.* 1997; 63:735-40.

116. Petroianu A. Splenic viability after segmental devascularization. *Rev Paul Med.* 1992; 110:39-41.
117. Petroianu A, Ferreira VL, Barbosa AJ. Morphology and viability of the spleen after subtotal splenectomy. *Braz J Med Biol Res.* 1989; 22:491-5.
118. Petroianu A, Simal CJ, Barbosa AJ. Splenic macrophage phagocytic function after subtotal splenectomy in the dog. *Med Sci Res.* 1992; 20:127-8.
119. Petroianu A, Simal CJ, Barbosa AJ. Impairment of phagocytosis by mammalian splenic macrophages by $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ sulphur colloid. *Med Sci Res.* 1992; 20:847-9.
120. Petroianu A, Barbosa AJ. Quantitative studies on macrophage phagocytosis in whole spleen and in the remnant of subtotal splenectomy. *Med Sci Res.* 1991; 19:373-5.
121. Petroianu A, Barbosa AJA. Splenic preservation based on preserved histology and phagocytic function using upper short gastric vessels. *Am J Surg.* 1995; 170:702.
122. Bader-Meunier B, Gauthier F, Archambaud F, Cynober T, Miélot F, Dommergues JP *et al.* Long-term evaluation of the beneficial effect of subtotal splenectomy for management of hereditary spherocytosis. *Blood.* 2001; 97:399-403.
123. Styrt BA. Risks of infection and protective strategies for the asplenic patient. *Infect Dis Clin Pract.* 1996; 5:94-100.
124. Moore FA, Moore EE, Moore GE, Millikan JS. Risk of splenic salvage after trauma. Analysis of 200 adults. *Am J Surg.* 1984; 148: 800-5.
125. Resende V, Petroianu A. Estudo funcional tardio de auto-implante esplênico após trauma complexo do baço humano. *Rev Col Bras Cir.* 2001; 28:165-70.

126. Petroianu A, Vidigal FM, Costa VC, Oliveira SC. Splenic autotransplantation in Gaucher's Disease. *Dig Surg.* 2000; 17:181-3.
127. Patel JM, Williams JS, Naim JO, Hinshaw JR. Protection against pneumococcal sepsis in splenectomized rats by implantation of splenic tissue into an omental pouch. *Surgery.* 1982; 91:638-41.
128. Livingston CD, Levine BA, Sirinek KR. Preservation of splenic tissue prevents postsplenectomy pulmonary sepsis following bacterial challenge. *J Surg Res.* 1982; 33:356-61.
129. Corazza GR, Tarozzi C, Vaira D, Frisoni M, Gasbarrini G. Return of splenic function after splenectomy: how much tissue is needed? *Br Med J.* 1984; 289:861-4.
130. Pabst R. Regeneration of autotransplanted splenic fragments: Basic immunological and clinical relevance. *Clin Exp Immunol.* 1999; 117:423-4.
131. Mikó I, Bráth E, Furka I, Kovács J, Kelvin D, Zhong R. Spleen autotransplantation in mice: a novel experimental model for immunology study. *Microsurgery.* 2001; 21:140-2
132. Moore FA, Moore EE, Moore GE, Erdoes L. Fivefold enlargement of implants in a splenic autotransplant recipient. *Surgery.* 1993; 113:462-5.
133. Petroianu A. Avaliação da função fagocitária em remanescentes de esplenectomia total e auto-implante esplênico autógeno. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2003; 25:25-30.
134. Weber T, Hanish E, Baum RP, Seufert RM. Late results of heterotopic autotransplantation of splenic tissue into greater omentum *World J Surg.* 1998, 22:883-9.
135. Cooney DR, Dearth JC, Swanson SE, Dewanjee MK, Telander RL. Relative merits of partial splenectomy, splenic reimplantation, and

- immunization in preventing post-splenectomy infection. *Surgery*. 1979; 86:561-9.
136. Iinuma H, Okinaga K, Sato S, Tomioka M, Matsumoto K. Optimal site and amount of splenic tissue for autotransplantation. *J Surg Res*. 1992; 53:109-16.
137. Lannig Nielsen J, Saksø P, Hanberg Sørensen F, Hvid Hansen H. Demonstration of splenic functions following splenectomy and autologous spleen implantation. *Acta Chir Scand*. 1984; 150:469-73.
138. Pabst R, Kamran D. Autotransplantation of splenic tissue. *J Pediatr Surg*. 1986; 21:120-4.
139. Marques RG, Petroianu A, Oliveira MB, Bernardo-Filho M. Importância do tecido esplênico para a fagocitose bacteriana. *Acta Cir Bras*. 2002; 17:388-93.
140. Marques RG, Petroianu A, Coelho JM, Portela MC. Regeneration of splenic autotransplants. *Ann Hematol*. 2002; 81:622-6.
141. Marques RG, Petroianu A, Coelho JM. Regeneration of phagocytic function after splenic autotransplantation. *Biom Res. (Aligarh)* 2002; 13:15-8.
142. Marques RG, Petroianu A, Coelho JM. Bacterial phagocytosis by macrophage of autogenous splenic implant. *Braz J Biol*. 2003; 63:1-4.
143. Marques RG, Petroianu A. Distribuição de *Escherichia coli* nos órgãos do sistema mononuclear fagocitário após esplenectomia total isolada ou combinada com auto-implante esplênico em rato. *Rev Col Bras Cir*. 2003; 30:330-6.
144. Marques RG, Petroianu A, Coelho JM, Portela MC. Morfologia e função fagocitária de implante esplênico autógeno regenerado em ratos. *Acta Cir Bras*. 2004; 19:642-8.
145. Tavassoli M, Ratzan RJ, Crosby WH. Studies on regeneration of heterotopic splenic autotransplants. *Blood*. 1973; 41:701-9.

146. Pabst R, Westermann J. Regeneration of autotransplanted splenic tissue is not proportional to total weight and size of transplanted fragments. *Pediatr Surg Int.* 1987; 2:161-3.
147. Pabst R, Reilmann H. Regeneration of heterotopically transplanted autologous splenic tissue. *Cell Tissue Res.* 1980; 209:137-43.
148. Krasna IH, Thompsom DA. Failure of autotransplantation of the spleen in dogs: an anatomic, radionuclide imaging, and pathologic study. *J Pediatr Surg.* 1985; 20:30-3.
149. Kudsk KA. Immunonutrition in surgery and critical care. *Annu Rev Nutr.* 2006; 26:463-79.
150. Senkal M, Zumtobel V, Bauer KH, Marpe B, Wolfram G, Frei A, Eickhoff U, Kemen M. Outcome and cost-effectiveness of perioperative enteral immunonutrition in patients undergoing elective upper gastrointestinal tract surgery. *Arch Surg.* 1999; 134:1309-16.
151. Braga M, Giannotti L, Radaelli G, Vignali A, Mari G, Gentilini O, Di Carlo V. Perioperative immunonutrition in patients undergoing cancer surgery: results of a randomized double-blind phase 3 trial. *Arch Surg.* 1999; 134:428-33.
152. Prabhu R, Thomas S, Balasubramanian KA. Oral glutamine attenuates surgical manipulation-induced alterations in intestinal brush border membrane. *J Surg Res.* 2003; 115:148-56.
153. Wishmeyer PE. Clinical application of L-glutamine: past, present and future. *Nut Clin Pract.* 2003; 18:377-85.
154. Pithon Curi TC, Trezena AG, Tavares-Lima W, Curi E. Evidence that glutamine is involved in neutrophil function. *Cell Biochem Funct.* 2002; 20:81-6.
155. Pithon-Curi TC, de Melo MP, Curi R. Glucose and glutamine utilization by rat lymphocytes, monocytes, and neutrophils in culture: a comparative study. *Cell Biochem Funct.* 2004, 22:321-6.

156. Kew S, Wells SM, Yaqoob P, Wallace FA, Miles EA, Calder PC. Dietary glutamine enhances murine T-lymphocyte responsiveness. *J Nutr.* 1999; 129:1524-31.
157. Yeh SL, Lai YN, Shang HF, Lin MT, Chen WJ. Effects of glutamine supplementation on innate immune response in rats with gut-derived sepsis. *Br J Nutr.* 2004; 91:423-9.
158. Yeh SL, Lai YN, Shang HF, Lin MT, Chiu WC, Chen WJ. Effects of glutamine supplementation on splenocyte cytokine mRNA expression in rats with septic peritonitis. *World J Gastroenterol.* 2005; 11:1742-6.
159. Yoo SS, Field CJ, McBurney MI. Glutamine supplementation maintains intramuscular glutamine concentrations and normalizes lymphocyte function in infected early weaned pigs. *J Nutr.* 1997; 127: 2253-9.
160. Figueiredo JA, Petroianu A, Correia MITD, Castro Júnior HA, Silveira ROP, Nunes CB, Abrantes MM. Effect of the nutritional supplementation with glycine and glutamine, oral feeding, in the colonic cicatrization in rabbits. *Rev Col Bras Cir.* 2009; 36:148-51.
161. Erbil Y, Öztezcan S, Giris M, Barbaros U, Olgaç V, Bilge H, Küçüçük H, Toker G. The effect of glutamine on radiation-induced organ damage. *Life Sci.* 2005; 78:376-82.
162. Diestel CF, Marques RG, Lopes-Paulo F, Paiva D, Horst NL, Caetano CE *et al.* Role of L-glutamine and glycine supplementation on irradiated colonic wall. *Int J Colorect Dis.* 2007; 12:1523-9.
163. Diestel CF, Marques RG, Lopes-Paulo F, Paiva D, Horst NL, Caetano CER *et al.* L-Glutamine supplementation optimizes the repair of the colonic mucosa in rats subjected to abdominal irradiation. *Nutr Res.* 2007; 27:647-52.

164. Gianotti L, Alexander JW, Gennari R, Pyles T, Babcock GF. Oral glutamine decreases bacterial translocation and improves survival in gut-origin sepsis. *J Parenter Enteral Nutr.* 1995; 19:69-74.
165. Margaritis VG, Filos KS, Michalaki MA, Scopa CD, Spiliopoulou I, Nikolopoulou VN *et al.* Effect of oral glutamine administration on bacterial translocation, endotoxemia, liver and ileal morphology, and apoptosis in rats with obstructive jaundice. *World J Surg.* 2005; 29: 1329-34.
166. Cadili A. Encapsulated bacterial infections following splenectomy. *Rev Med Microbiol.* 2010; 21:7-10.
167. Ejstrud P, Kristensen B, Hansen JB, Madsen KM, Schonheyder HC, Sorensen HT. Risk and patterns of bacteraemia after splenectomy: a population-based study. *Scand J Infect Dis.* 2000; 32:521-5.
168. Davidson RN, Wall RA. Prevention and management of infections in patients without spleen. *Clin Microbiol Infect.* 2001; 7:657-60.
169. Cadili A, de Gara C. Complications of splenectomy. *Am J Med.* 2008; 121:371-5.
170. Marques RG, Petroianu A. Infecção fulminante pós-esplenectomia. *Arq Gastroenterol.* 2003; 40:47-54.
171. Calder PC. Immunonutrition. *BMJ.* 2003; 327:117-8.
172. Corazza GR, Zoli G, Massai G, Mulè P, Beltrandi E, Gasbarrini G. Changes in peripheral blood lymphocytes and immune complexes in splenectomized patients: lack of correlation with residual splenic function. *J Clin Lab Immunol* 1990; 31:33-8.
173. Tsai MC, Lin SL, Chuang CY. Changes in T-lymphocyte subpopulations in patients splenectomized for trauma. *J Formos Med Assoc* 1991; 90:240-3.

174. Bessler H, Bergman M, Salman H, Beilin B, Djaldetti M. The relationship between partial splenectomy and peripheral leukocyte count. *J Surg Res.* 2004; 122:49-53.
175. Horowitz J, Leonard D, Smith J, Brotman S. Postsplenectomy leukocytosis: physiologic or an indicator of infection? *Am Surg.* 1992; 58:387-90.
176. Rutherford EJ, Morris JA Jr, van Aalst J, Hall KS, Reed GW, Koestner JA. The white blood cell response to splenectomy and bacteraemia. *Injury.* 1994; 25:289-92.
177. McBride JA, Dacie JV, Shapley R. The Effect of splenectomy on the leucocyte count. *Br J Haematol.* 1968; 14: 225-31.
178. Djaldetti M, Bergman M, Salman H, Cohen AM, Fibach E, Bessler H. On the mechanism of post-splenectomy leukocytosis in mice. *Eur J Clin Invest.* 2003; 33:811-7.
179. Palmer JG, Kemp I, Cartwright GE, Wintrobe MM. Studies on the effect of splenectomy on the total leukocyte count in the albino rat. *Blood.* 1951; 6:3-15.
180. Wolf HM, Eibl MM, Georgi E, Samstag A, Spatz M, Uranüs S, Passl R. Long-term decrease of CD4⁺CD45RA⁺ T cells and impaired primary immune response after post-traumatic splenectomy. *Br J Haematol.* 1999; 107:55-68.
181. Dürig M, Landmann RM, Harder F. Lymphocyte subsets in human peripheral blood after splenectomy and autotransplantation of splenic tissue. *J Lab Clin Med* 1984; 104:110-5.
182. Brodsky E, Steiner Z, Manor Y, Schneider M, Druker I, Klajman A. Changes in lymphocyte subpopulations in peripheral blood of splenectomized patients. *Isr J Med Sci* 1988; 24:702-5.
183. Graffner H, Gullstrand P, Hallberg T. Immunocompetence after incidental splenectomy. *Scand J Haematol* 1982; 28:369-75.

184. Cohen RC, Ferrante A. Immune dysfunction in the presence of residual splenic tissue. *Arch Dis Child*. 1982; 57:523-7.
185. Nielsen JL, Buskjaer L, Lamm LU, Solling J, Ellegaard J. Complement studies in splenectomized patients. *Scand J Haematol* 1983; 30:194-200.
186. Lüdtke FE, Schuff-Werner P, Lion KA, Speer CP. Immunorestorative effects of reimplanted splenic tissue and splenosis. *J Surg Res* 1990; 49:413-8.
187. Westermann J, Schwinzer R, Jecker P, Pabst R. Lymphocyte subsets in the blood. The influence of splenectomy, splenic autotransplantation, ageing, and site of blood sampling on the number of B, T, CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes in the rat. *Scand J Immunol* 1990; 31:327-34.
188. Reinecke G & Pabst R. Subsets of blood, spleen and recirculation lymphocytes in man. *Clin Exp Immunol* 1983; 53:672-8.
189. Westermann J, Pabst R. Autotransplantation of splenic fragments: lymphocyte subsets in blood, lymph nodes, and splenic tissue. *Clin Exp Immunol* 1986; 64:188-94.
190. Milićević NM, Luettig B, Trautwein C, Wüstefeld T, Mähler M, Jecker P, Wonigeit K, Westermann J. Splenectomy of rats selectively reduces lymphocyte function-associated antigen 1 and intercellular adhesion molecule 1 expression on B-cell subsets in blood and lymph nodes. *Blood* 2001; 98:3035-41.
191. Theodorou GL, Mouzaki A, Tsiftsis D, Apostolopoulou A, Mougiou A, Theodori E *et al*. Effect of non-operative management (NOM) of splenic rupture *versus* splenectomy on the distribution of peripheral blood lymphocyte populations and cytokine production by T cells. *Clin Exp Immunol* 2007; 150:429-36.
192. Airò P, Ferrari C, Franceschini F, Pelizzari E, Giambuzzi M, Cattaneo R, Airò R. Lymphocyte subpopulations, immunoglobulin levels and

- delayed-type hypersensitivity reactions in healthy splenectomized patients. *Haematologica* 1987; 72:305-9.
193. Garcia-Suarez J, Prieto A, Reyes E, Arribalzaga K, Perez-Machado MA, Lopez-Rubio M *et al.* Persistent lymphocytosis of natural killer cells in autoimmune thrombocytopenic purpura (ATP) patients after splenectomy. *Br J Haematol* 1995; 89:653-5.
 194. Demeter J, Pálóczi K, Lehoczky D, Benczur M. Observations on NK cells, K cells and on their function a long time after posttraumatic splenectomy. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990; 92:287-92.
 195. Drew PA, Kiroff GK, Ferrante A, Cohen RC. Alterations in immunoglobulin synthesis by peripheral blood mononuclear cells from splenectomized patients with and without splenic regrowth. *J Immunol* 1984; 132:191-6.
 196. Karakantza M, Theodorou GL, Mouzaki A, Theodori E, Vagianos C, Maniatis A. *In vitro* study of the long-term effects of post-traumatic splenectomy on cellular immunity. *Scand J Immunol* 2004; 59:209-19.
 197. Ferrante A, Kiroff GK, Goh DH, Drew PA. Elevated natural killer (NK) cell activity: a possible role in resistance to infection and malignancy in immunodeficient splenectomized patients. *Med Hypotheses* 1985; 16:133-46
 198. Ardawi MS, Newsholme EA. Maximum activities of some enzymes of glycolysis, the tricarboxylic acid cycle and ketone-body and glutamine utilization pathways in lymphocytes of the rat. *Biochem J* 1982; 208:743-8.
 199. Newsholme EA, Calder PC. The proposed role of glutamine in some cells of the immune system and speculative consequences for the whole animal. *Nutrition* 1997; 13:728-30.
 200. Smith E, De Young NJ, Drew PA. Immune cell subpopulations in regenerated splenic tissue in rats. *Aut N Z Surg* 1999; 69:522-5.

201. Clayer M, Drew P, Leong A, Jamieson GG. The vascular supply of splenic autotransplants. *J Surg Res* 1992; 53:475-84.
202. Clayer MT, Drew PA, Leong AS, Jamieson GG. IgG-mediated phagocytosis in regenerated splenic tissue. *Clin Exp Immunol* 1994; 97:242-7.
203. Timens W, Boes A, Rozeboom-Uiterwijk T, Poppema S. Immaturity of the human splenic marginal zone in infancy. Possible contribution to the deficient infant immune response. *J Immunol* 1989; 143:3200-6.
204. Spencer J, Perry ME, Dunn-Walters DK. Human marginal-zone B cells. *Immunol Today* 1998; 19:421-6.

APÊNDICE

Evolução do peso corporal dos animais

Tab. A1. Peso dos animais (g) de todos os grupos, ao início do experimento.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	153,65	141,54	160,19	154,56	156,00	155,15	157,64	140,00
2	144,00	145,44	141,18	139,89	154,00	156,00	162,30	154,00
3	146,00	138,17	145,18	152,00	165,03	160,00	158,20	152,12
4	150,00	150,00	142,00	156,00	157,37	149,96	170,63	151,52
5	160,00	150,00	148,00	146,00	147,61	179,18	142,72	168,27
6	162,00	152,00	148,00	152,00	161,25	145,12	148,21	162,16
7	138,02	146,31	162,00	160,89	153,68	140,39	162,84	159,25

Tab. A2. Peso dos animais (g) de todos os grupos, na 6.^a semana de experimento.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	427,99	414,65	361,28	369,81	368,93	376,41	372,44	319,38
2	355,61	461,60	409,61	376,74	311,72	325,41	306,85	397,22
3	367,48	360,78	401,62	340,55	337,01	320,45	316,10	334,82
4	331,17	340,02	353,61	350,01	332,12	394,90	326,77	371,86
5	300,31	370,63	377,34	348,39	305,78	319,23	358,24	285,49
6	329,07	286,45	329,05	293,85	382,64	323,14	346,47	354,16
7	307,96	418,23	314,56	363,23	396,82	399,36	302,40	364,80

Tab. A3. Peso dos animais (g) dos grupos I, II, III, V, VI e VII, na 12^a semana de experimento.

Animais	I	II	III	V	VI	VII
1	520,88	459,04	440,60	402,41	408,80	421,69
2	414,19	529,29	455,69	328,51	398,74	422,21
3	426,86	383,53	456,78	402,89	400,07	323,30
4	393,05	386,15	405,49	400,10	363,14	393,44
5	322,33	418,52	415,43	343,19	361,85	400,51
6	358,01	280,22	373,76	457,35	389,76	430,36
7	356,94	427,85	360,18	421,53	382,84	367,24

Peso dos baços e auto-implantes

Tab. A4. Peso dos baços (g) dos animais dos grupos II, III, IV, VI, VII e VIII, no momento do procedimento cirúrgico.

Animais	II	III	IV	VI	VII	VIII
1	0,95	0,80	0,84	0,87	1,11	1,60
2	1,08	1,02	1,00	1,34	0,95	0,97
3	0,81	0,86	0,84	1,24	1,05	1,39
4	0,66	0,83	0,84	0,87	1,22	0,65
5	0,88	0,63	0,62	0,83	0,87	0,60
6	0,95	0,44	0,83	0,97	0,80	0,89
7	0,69	0,58	0,99	0,56	0,91	1,01

Tab. A5. Massa (g) de tecido esplênico regenerado nos animais dos grupos III, IV, VII e VIII.

Animais	III	IV	VII	VIII
1	0,27	0,44	0,35	0,32
2	0,25	0,3	0,34	0,30
3	0,1	0,44	0,31	0,45
4	0,29	0,11	0,36	0,19
5	0,31	0,19	0,22	0,26
6	0,28	0,19	0,28	0,25
7	0,29	0,47	0,31	0,32

Tab. A6. Percentual de tecido esplênico regenerado em relação ao implantado nos animais dos grupos III, IV, VII e VIII.

Animais	III	IV	VII	VIII
1	33,75	52,38	31,53	20,00
2	24,51	30	35,79	30,93
3	11,63	52,38	29,52	32,37
4	34,94	13,1	29,51	29,23
5	49,21	30,65	25,29	43,33
6	63,64	22,89	35,00	28,09
7	50	47,47	34,07	31,68

Análises sanguíneas

Hemograma (série branca)

Tab. A7. Leucometria total (células/mm³), no início do experimento, por grupo de animais.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	8,9	17,8	13,1	4,4	12,5	6	12,2	16,4
2	9,2	10,6	7,7	9,5	8,7	11,3	6,5	13,6
3	4,4	9,8	12,2	9,2	16,3	7,7	11,7	6,5
4	11,1	10,8	11,1	8,1	16,7	11,2	11,7	12,2
5	7,9	7	11,3	12,1	11,6	6,5	13,3	8,8
6	12,3	12,3	5,7	8,2	13,4	13,1	12,4	12,7
7	13,9	9,2	11,1	12,4	13,6	5,7	4	13,7

Tab. A8. Contagem absoluta de linfócitos (células/mm³), no início do experimento, por grupo de animais.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	7,6	15,3	9,1	3,5	10,5	4,7	9,4	12,5
2	7,6	7,4	6	7,9	7,4	9,6	5,2	11
3	3,4	8,4	9,4	7,4	12,9	6,4	9,5	5,2
4	9,2	8,4	9,7	6,7	13	8,1	9	10,4
5	6,6	6	9	10,2	8,4	5,3	9,3	7,1
6	10,2	9,6	4,5	6,7	7,9	9,4	11,3	8,7
7	11	7,2	9	10,2	10,7	4,8	3,3	11,7

Tab. A9. Contagem relativa (%) de linfócitos, no início do experimento, por grupo de animais.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	85,4	86	69,5	79,5	84	78,3	77	76,2
2	82,6	69,8	77,9	83,2	85,1	85	80	80,9
3	77,3	85,7	77	80,4	79,1	83,1	81,2	80
4	82,9	77,8	87,4	82,7	77,8	72,3	76,9	85,2
5	83,5	85,7	79,6	84,3	72,4	81,5	69,9	80,7
6	82,9	78	78,9	81,7	59	71,8	91,1	68,5
7	79,1	78,3	81,1	82,3	78,7	84,2	82,5	85,4

Tab. A10. Contagem absoluta de neutrófilos (células/mm³), no início do experimento, por grupo de animais.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	0,8	1,9	2,6	0,7	1,8	0,9	2,2	1,6
2	1,3	2,4	1,1	1,4	1	1,4	1,1	1,9
3	0,8	1,1	2,4	1,4	2,9	1,1	1,8	1,1
4	1,5	1,8	1,1	1,2	2,7	1,5	1,8	1,4
5	1,0	0,9	1,7	1,5	1,3	0,6	3,5	1,4
6	1,8	2,1	1	1	2,8	2,4	0,6	2,6
7	2,1	1,5	1	1,8	1,2	0,4	0,4	1,1

Tab. A11. Contagem relativa (%) de neutrófilos, no início do experimento, por grupo de animais.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	9	10,7	19,8	15,9	14,4	15	18	9,8
2	14,1	22,6	14,3	14,7	11,5	12,4	16,9	14
3	18,2	11,2	19,7	15,2	17,8	14,3	15,4	16,9
4	13,5	16,7	9,9	14,8	16,2	13,4	15,4	11,5
5	12,7	12,9	15	12,4	11,2	9,2	26,3	15,9
6	14,6	17,1	17,5	12,2	20,9	18,3	4,8	20,5
7	15,1	16,3	9	14,5	8,8	7	10	8

Tab. A12. Contagem absoluta de basófilos, eosinófilos e monócitos (células/mm³), no início do experimento, por grupo de animais.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	0,5	0,6	1,4	0,2	0,2	0,4	0,6	2,3
2	0,3	0,8	0,6	0,2	0,3	0,3	0,2	0,7
3	0,2	0,3	0,4	0,4	0,5	0,2	0,4	0,2
4	0,4	0,6	0,3	0,2	1	1,6	0,9	0,4
5	0,3	0,1	0,6	0,4	1,9	0,6	0,5	0,3
6	0,3	0,6	0,2	0,5	2,7	1,3	0,5	1,4
7	0,8	0,5	1,1	0,4	1,7	0,5	0,3	0,9

Tab. A13. Contagem relativa (%) de basófilos, eosinófilos e monócitos, no início do experimento, por grupo de animais.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	5,6	3,4	10,7	4,5	1,6	6,7	4,9	14,0
2	3,3	7,5	7,8	2,1	3,4	2,7	3,1	5,1
3	4,5	3,1	3,3	4,3	3,1	2,6	3,4	3,1
4	3,6	5,6	2,7	2,5	6	14,3	7,7	3,3
5	3,8	1,4	5,3	3,3	16,4	9,2	3,8	3,4
6	2,4	4,9	3,5	6,1	20,1	9,9	4	11,0
7	5,8	5,4	9,9	3,2	12,5	8,8	7,5	6,6

Tab. A14. Leucometria total (células/mm³) na 6.^a semana de experimento, nos ratos dos grupos IV e VIII, e na 12.^a semana de experimento, nos animais dos grupos I, II, III, V, VI e VII.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	11,6	16,4	18,7	14,5	13,2	16,1	16,9	18,3
2	11,5	11,6	16,8	14,3	12,0	16,5	13,9	16,6
3	6,8	16,4	8,2	12,2	15,1	13,5	16,1	12,0
4	12,6	13,4	13,0	14,3	17,5	15,6	14,0	11,4
5	9,2	9,2	17,6	20,0	13,6	15,5	17,2	13,2
6	19,5	20,0	18,0	8,5	14,8	18,7	14,0	15,0
7	10,4	18,3	18,2	15,7	11,9	17,1	14,5	14,2

Tab. A15. Contagem absoluta de linfócitos (células/mm³) na 6.^a semana de experimento, nos ratos dos grupos IV e VIII, e na 12.^a semana de experimento, nos animais dos grupos I, II, III, V, VI e VII.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	9,7	14,0	15,8	11,5	10,1	11,9	13,3	15
2	9,1	9,3	13,8	11,7	9,6	13,3	11,5	13,7
3	5,3	13,1	6,4	10,1	11,3	10,7	12,3	9,3
4	9,8	10,0	10,3	11,5	14,4	10,4	8,9	9,1
5	7,1	7,0	13,4	15,7	10,5	12,1	13,0	10,6
6	14,6	14,2	15,3	6,3	10,3	13,4	11,5	11,4
7	8,7	14,1	13,9	11,9	8,3	11,7	11,1	12,1

Tab. A16. Contagem relativa de linfócitos (%) na 6.^a semana de experimento, nos ratos dos grupos IV e VIII, e na 12.^a semana de experimento, nos animais dos grupos I, II, III, V, VI e VII.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	83,62	85,37	84,49	79,31	76,5	73,9	78,7	81,97
2	79,13	80,17	82,14	81,82	80,0	80,6	82,7	82,53
3	77,94	79,88	78,05	82,79	74,8	79,3	76,4	77,50
4	77,78	74,63	79,23	80,42	82,3	66,7	63,6	79,82
5	77,17	76,09	76,14	78,50	77,2	78,1	75,6	80,30
6	74,87	71,00	85,00	74,12	69,6	71,7	82,1	76,00
7	83,65	77,05	76,37	75,80	69,7	68,4	76,6	85,21

Tab. A17. Contagem absoluta de neutrófilos (células/mm³) na 6.^a semana de experimento, nos ratos dos grupos IV e VIII, e na 12.^a semana de experimento, nos animais dos grupos I, II, III, V, VI e VII.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	1,4	1,5	1,9	2,3	2,0	2,7	2,6	2,5
2	1,5	1,9	2,3	1,9	1,9	2,3	2,2	2,6
3	0,9	2,4	1,4	1,8	2,4	1,9	2,5	2,0
4	1,8	2,1	1,5	1,8	2,1	3,0	3,4	2,1
5	1,3	2,1	2,6	3,3	1,7	2,1	3,2	1,8
6	3,8	4,0	2,0	1,4	3,6	2,9	1,5	3,0
7	1,3	3,1	2,9	2,5	2,5	3,4	1,6	1,7

Tab. A18. Contagem relativa de neutrófilos (%) na 6.^a semana de experimento, nos ratos dos grupos IV e VIII, e na 12.^a semana de experimento, nos animais dos grupos I, II, III, V, VI e VII.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	12,1	9,1	10,2	15,86	15,2	16,8	15,4	13,7
2	13,0	16,4	13,7	13,29	15,8	13,9	15,8	15,7
3	13,2	14,6	17,1	14,75	15,9	14,1	15,5	16,7
4	14,3	15,7	11,5	12,59	12,0	19,2	24,3	18,4
5	14,1	22,8	14,8	16,50	12,5	13,5	18,6	13,6
6	19,5	20,0	11,1	16,47	24,3	15,5	10,7	20,0
7	12,5	16,9	15,9	15,92	21,0	19,9	11,0	12,0

Tab. A19. Contagem absoluta de basófilos, eosinófilos e monócitos (células/mm³) na .6^a semana de experimento, nos ratos dos grupos IV, e VIII e na 12.^a semana de experimento, nos animais dos grupos I, II, III, V, VI e VII.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	0,5	0,9	1,0	0,7	1,1	1,5	1,0	0,8
2	0,9	0,4	0,7	0,7	0,5	0,9	0,2	0,3
3	0,6	0,9	0,4	0,3	1,4	0,9	1,3	0,7
4	1,0	1,3	1,2	1,0	1,0	2,2	1,7	0,2
5	0,8	0,1	1,6	1,0	1,4	1,3	1,0	0,8
6	1,1	1,8	0,7	0,8	0,9	2,4	1,0	0,6
7	0,4	1,1	1,4	1,3	1,1	2,0	1,8	0,4

Tab. A20. Contagem relativa (%) de basófilos, eosinófilos e monócitos na 6.^a semana de experimento, nos ratos dos grupos IV e VIII, e na 12.^a semana de experimento, nos animais dos grupos I, II, III, V, VI e VII.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	4,3	5,5	5,3	4,8	8,3	9,3	5,9	4,4
2	7,8	3,4	4,2	4,9	4,2	5,5	1,4	1,8
3	8,8	5,5	4,9	2,5	9,3	6,7	8,1	5,8
4	7,9	9,7	9,2	7,0	5,7	14,1	12,1	1,8
5	8,7	1,1	9,1	5,0	10,3	8,4	5,8	6,1
6	5,6	9,0	3,9	9,4	6,1	12,8	7,1	4,0
7	3,8	6,0	7,7	8,3	9,2	11,7	12,4	2,8

Citometria de fluxo

Sangue periférico

Tab. A21. Contagem relativa (%) de linfócitos no início do experimento, por grupo de animais.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	41,08	31,68	39,99	51,42	29,74	28,10	27,64	30,50
2	22,70	31,93	31,54	35,45	35,08	30,58	40,93	37,18
3	25,30	37,45	39,14	31,44	33,81	41,14	42,08	27,63
4	28,62	43,07	29,46	28,52	35,08	31,78	31,91	37,44
5	24,57	31,56	38,54	34,88	31,49	39,85	30,96	36,22
6	45,92	26,87	27,06	24,38	43,49	36,79	44,32	41,77
7	32,88	35,33	38,41	37,12	45,11	30,17	44,57	43,45

Tab. A22. Contagem absoluta de linfócitos (células/mm³) no início do experimento, por grupo de animais.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	3122	4847	3639	1800	3123	1321	2598	3813
2	1725	2363	1892	2801	2596	2936	2128	4090
3	860	3146	3679	2327	4361	2633	3998	1437
4	2633	3618	2858	1911	4560	2574	2872	3894
5	1622	1894	3469	3558	2645	2112	2879	2572
6	4684	2580	1218	1633	3436	3458	5008	3634
7	3617	2544	3457	3786	4827	1448	1471	5084

Tab. A23. Contagem relativa (%) de linfócitos T-CD4 no início do experimento, por grupo de animais.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	35,74	37,81	40,57	49,67	44,01	59,64	42,33	51,84
2	39,37	31,80	32,04	40,08	34,78	45,37	47,79	51,35
3	41,30	40,35	33,59	17,28	31,10	55,40	45,37	43,40
4	40,47	41,14	45,46	33,57	38,34	40,81	42,96	31,79
5	48,92	36,60	34,47	35,07	35,95	40,25	48,31	44,51
6	51,14	45,40	44,33	45,13	42,17	23,30	41,25	41,10
7	34,15	47,35	55,22	42,70	40,57	36,26	41,70	47,69

Tab. A24. Contagem absoluta de linfócitos T-CD4 (células/mm³) no início do experimento, por grupo de animais.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	2716	5785	3692	1738	4621	2803	3979	6480
2	2992	2353	1922	3166	2574	4356	2381	5649
3	1404	3389	3157	1279	4012	3546	4310	2257
4	3723	3456	4410	2249	4984	3306	3866	3306
5	3229	2196	3102	3577	3020	2133	4493	3160
6	5216	4358	1995	3024	3331	2190	4661	3576
7	3757	3409	4970	4355	4341	1740	1376	5580

Tab. A25. Contagem relativa (%) de linfócitos T-CD8 α no início do experimento, por grupo de animais.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	22,79	19,70	27,03	23,38	36,27	34,74	28,66	27,88
2	23,96	20,13	25,94	31,87	30,74	26,28	26,05	32,36
3	23,04	27,98	28,07	28,28	32,75	30,17	28,88	33,06
4	23,34	20,76	31,34	20,42	24,56	15,79	30,21	23,17
5	37,69	23,18	25,38	25,50	21,75	20,67	29,64	21,30
6	29,79	29,97	28,79	29,17	27,51	19,59	24,38	26,67
7	24,24	34,03	30,94	30,12	25,37	15,57	25,56	21,26

Tab. A26. Contagem absoluta de linfócitos T-CD8 α (células/mm³) no início do experimento, por grupo de animais.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	1732	3014	2460	818	3808	1633	2694	3485
2	1821	1490	1556	2518	2275	2523	1355	3560
3	783	2350	2639	2093	4225	1931	2744	1719
4	2147	1744	3040	1368	3193	1279	2719	2410
5	2488	1391	2284	2601	1827	1096	2757	1512
6	3039	2877	1296	1954	2173	1841	2755	2320
7	2666	2450	2785	3072	2715	747	843	2487

Tab. A27. Contagem relativa (%) de linfócitos T-CD8 β no início do experimento, por grupo de animais.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	12,36	10,31	11,37	15,47	10,41	9,87	8,42	9,31
2	9,77	7,79	11,09	10,73	11,90	10,78	13,81	11,93
3	16,25	10,74	11,20	8,31	11,55	14,07	13,52	13,68
4	8,12	11,69	7,82	7,25	11,56	8,11	9,08	10,64
5	10,75	11,37	14,71	12,43	9,56	11,28	8,18	10,10
6	15,12	8,76	7,19	8,85	13,51	10,23	12,42	14,16
7	11,60	11,16	11,95	11,69	14,63	9,09	13,43	12,72

Tab. A28. Contagem absoluta de linfócitos T-CD8 β (células/mm³) no início do experimento, por grupo de animais.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	939	1577	1035	541	1093	464	791	1164
2	743	576	665	848	881	1035	718	1312
3	553	902	1053	615	1490	900	1284	711
4	747	982	759	486	1503	657	817	1107
5	710	682	1324	1268	803	598	761	717
6	1542	841	324	593	1067	962	1403	1232
7	1276	804	1076	1192	1565	436	443	1488

Tab. A29. Contagem relativa (%) de linfócitos B de zona marginal de baço no início do experimento, por grupo de animais.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	4,22	5,40	7,62	9,58	6,83	5,12	7,58	6,66
2	8,40	4,73	4,36	6,08	7,10	5,54	5,05	6,99
3	4,53	6,80	5,65	5,44	8,26	9,63	5,54	8,73
4	5,56	4,68	7,48	6,64	7,09	5,12	8,09	10,32
5	5,20	9,60	7,71	5,26	8,11	9,61	9,07	10,51
6	7,42	5,62	9,30	6,77	7,61	8,55	6,26	6,86
7	5,49	5,33	7,49	5,40	9,35	6,88	8,75	4,62

Tab. A30. Contagem absoluta de linfócitos B de zona marginal de baço (células/mm³) no início do experimento, por grupo de animais.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	321	826	693	335	717	241	713	833
2	638	350	262	480	525	532	263	769
3	154	571	531	403	1066	872	526	454
4	512	393	726	445	922	415	728	1073
5	343	576	694	537	681	509	844	746
6	757	540	419	454	601	804	707	597
7	604	384	674	551	1000	330	289	541

Tab. A31. Contagem relativa (%) de linfócitos T totais na 6.^a semana de experimento, nos ratos dos grupos IV e VIII, e na 12.^a semana de experimento, nos animais dos grupos I, II, III, V, VI e VII.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	37,03	23,75	26,56	27,49	34,49	25,72	14,79	18,77
2	35,70	12,50	27,55	20,24	37,90	16,65	34,65	25,32
3	30,87	24,42	28,14	25,58	36,03	17,42	19,82	22,65
4	28,92	14,21	28,48	23,97	35,52	30,99	28,72	25,46
5	26,36	24,57	24,95	23,40	39,12	29,66	33,77	36,98
6	29,75	22,72	25,69	22,92	34,51	32,04	33,56	36,96
7	36,50	19,40	28,75	23,84	31,78	22,91	28,90	30,46

Tab. A32. Contagem absoluta de linfócitos T totais (células/mm³) na 6.^a semana de experimento, nos ratos dos grupos IV e VIII, e na 12.^a semana de experimento, nos animais dos grupos I, II, III, V, VI e VII.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	3592	3325	4196	3161	3483	3061	1967	2816
2	3249	513	3802	2368	3638	2214	3985	3469
3	1636	3199	1801	2584	4071	1864	2438	2106
4	2834	1421	2933	2757	5115	3223	2556	2317
5	1872	1720	3343	3674	4108	3589	4390	3920
6	4344	3226	3931	1444	3555	4293	3859	4213
7	1825	2735	3996	2837	2638	2680	3208	3686

Tab. A33. Contagem relativa (%) de linfócitos T-CD4 na 6.^a semana de experimento, nos ratos dos grupos IV e VIII, e na 12.^a semana de experimento, nos animais dos grupos I, II, III, V, VI e VII.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	38,41	19,57	43,57	31,66	41,02	39,24	45,05	51,31
2	59,02	23,94	32,33	29,71	40,31	40,48	39,69	50,44
3	23,38	28,70	13,84	16,41	48,05	34,34	34,36	45,68
4	47,13	32,12	31,25	18,50	41,69	32,55	31,17	44,17
5	45,37	22,89	35,17	16,51	37,28	27,8	38,49	53,64
6	42,04	20,18	42,29	25,75	32,44	33,89	42,74	28,67
7	32,54	19,98	26,99	19,98	33,84	32,76	47,89	26,87

Tab. A34. Contagem absoluta de linfócitos T-CD4 (células/mm³) na 6.^a semana de experimento, nos ratos dos grupos IV e VIII, e na 12.^a semana de experimento, nos animais dos grupos I, II, III, V, VI e VII.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	3726	2740	6884	3641	4143	4670	5992	7697
2	5371	982	4462	3476	3870	5384	4564	6910
3	1239	3760	886	1657	5430	3674	4226	4248
4	4619	3212	3219	2128	6003	3385	2774	4019
5	3221	1602	4713	2592	3914	3364	5004	5686
6	6138	2866	6470	1622	3341	4541	4915	3268
7	1627	2817	3752	2378	2809	3833	5316	3251

Tab. A35. Contagem relativa (%) de linfócitos T-CD8 α na 6.^a semana de experimento, nos ratos dos grupos IV e VIII, e na 12.^a semana de experimento, nos animais dos grupos I, II, III, V, VI e VII.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	26,89	28,60	23,70	15,30	21,55	20,14	19,20	30,99
2	33,48	28,36	25,34	16,02	32,40	26,12	27,55	32,50
3	27,55	20,38	21,14	21,94	24,19	22,73	19,49	22,45
4	24,69	25,90	26,61	24,30	28,77	17,67	27,61	20,90
5	28,24	24,94	24,35	17,81	17,85	24,48	22,65	17,37
6	24,71	16,26	22,83	14,44	24,12	23,12	26,24	17,93
7	18,51	24,64	23,01	36,78	22,48	17,71	15,25	14,23

Tab. A36. Contagem absoluta de linfócitos T-CD8 α (células/mm³) na 6.^a semana de experimento, nos ratos dos grupos IV e VIII, e na 12.^a semana de experimento, nos animais dos grupos I, II, III, V, VI e VII.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	2044	4376	2157	536	2177	2397	2554	4649
2	2544	2099	1520	1266	3110	3474	3168	4453
3	937	1712	1987	1624	2733	2432	2397	2088
4	2271	1554	2581	1628	4143	1838	2457	1902
5	1864	2095	2192	1817	1874	2962	2945	1841
6	2520	1561	1027	967	2484	3098	3018	2044
7	2036	1774	2071	3752	1866	2072	1693	1722

Tab. A37. Contagem relativa (%) de linfócitos T-CD8 β na 6.^a semana de experimento, nos ratos dos grupos IV e VIII, e na 12.^a semana de experimento, nos animais dos grupos I, II, III, V, VI e VII.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	9,50	9,31	10,63	7,80	10,68	7,58	3,92	5,73
2	5,45	3,73	8,10	6,18	10,12	6,22	12,09	8,24
3	9,28	5,78	5,12	9,60	11,48	10,95	2,89	6,15
4	9,18	3,71	5,38	6,45	10,05	8,73	2,28	6,27
5	8,33	6,21	8,91	9,35	9,54	8,60	12,37	9,88
6	8,79	7,41	7,22	6,43	12,95	5,74	15,06	9,95
7	17,57	5,82	9,48	6,35	13,62	8,30	8,76	8,03

Tab. A38. Contagem absoluta de linfócitos T-CD8 β (células/mm³) na 6.^a semana de experimento, nos ratos dos grupos IV e VIII, e na 12.^a semana de experimento, nos animais dos grupos I, II, III, V, VI e VII.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	922	1303	1680	897	1079	902	521	860
2	496	153	1118	723	972	827	1390	1129
3	492	757	328	970	1297	614	355	572
4	900	371	554	742	1447	908	203	571
5	591	435	1194	1468	1002	1041	1608	1047
6	1283	1052	1105	405	1334	1467	1732	1134
7	879	821	1318	756	1130	971	972	972

Tab. A39. Contagem relativa (%) de linfócitos B na 6.^a semana de experimento, nos ratos dos grupos IV e VIII, e na 12.^a semana de experimento, nos animais dos grupos I, II, III, V, VI e VII.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	5,02	7,74	8,27	16,30	9,15	5,80	12,32	2,05
2	8,36	5,86	10,02	17,36	6,07	4,30	7,64	2,76
3	4,42	6,38	4,33	13,28	4,79	6,00	9,19	4,05
4	6,40	4,94	4,12	8,97	4,66	12,77	4,66	9,56
5	4,71	10,26	5,47	9,43	10,98	12,45	6,07	9,40
6	9,39	6,81	5,12	15,30	11,03	13,42	11,55	9,65
7	4,78	7,79	10,37	3,53	10,59	9,02	11,10	8,54

Tab. A40. Contagem absoluta de linfócitos B (células/mm³) na 6.^a semana de experimento, nos ratos dos grupos IV e VIII, e na 12.^a semana de experimento, nos animais dos grupos I, II, III, V, VI e VII.

Animais	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1	487	1084	1307	1875	924	690	1639	308
2	761	240	1383	2031	583	572	879	378
3	234	836	277	1341	541	642	1130	377
4	627	494	424	1032	671	1328	415	870
5	334	718	733	1481	1153	1506	789	996
6	1371	967	783	964	1136	1798	1328	1100
7	239	1098	1441	420	879	1055	1232	1033

Células do baço e dos auto-implantes esplênicos

Tab. A41. Contagem de células nucleadas nos baços e auto-implantes esplênicos nas 6.^a e 12.^a semanas de experimento, nos grupos suplementados e não suplementados com L-glutamina.

Animais	II	III	IV	VI	VII	VIII
1	563	195	76	991	256	655
2	289	70	161	772	781	519
3	540	131	141	712	180	450
4	615	42	66	361	630	182
5	623	16	145	598	89	251
6	617	38	129	539	359	483
7	638	57	93	907	194	249

Tab. A42. Contagem absoluta (células / g de tecido) de linfócitos T totais nos fragmentos de baço e de auto-implante esplênico.

Animais	II	III	IV	VI	VII	VIII
1	195	36	18	263	31	152
2	82	14	28	220	118	65
3	138	28	29	159	26	95
4	173	7	9	96	128	34
5	176	3	17	141	16	45
6	175	7	25	172	79	94
7	242	11	17	302	32	39

Tab. A43. Contagem relativa (%) de linfócitos T totais nos fragmentos de baço e de auto-implante esplênico.

Animais	II	III	IV	VI	VII	VIII
1	34,55	18,27	24,21	26,57	12,11	23,24
2	28,26	19,66	17,48	28,51	15,14	12,48
3	25,47	21,11	20,37	22,29	14,53	21,07
4	28,21	17,53	13,54	26,59	20,28	18,74
5	28,27	19,36	12,00	23,50	17,46	17,85
6	28,36	18,73	19,31	31,90	21,87	19,37
7	37,86	18,77	18,49	33,35	16,44	15,62

Tab. A44. Contagem absoluta (células / g de tecido) de linfócitos T – CD4 nos fragmentos de baço e de auto-implante esplênico.

Animais	II	III	IV	VI	VII	VIII
1	146	44	18	398	55	180
2	83	16	28	296	261	162
3	112	29	42	311	30	92
4	226	10	18	146	155	36
5	227	5	40	224	16	54
6	294	10	35	172	97	138
7	278	7	19	365	48	54

Tab. A45. Contagem relativa (%) de linfócitos T-CD4 nos fragmentos de baço e de auto-implante esplênico.

Animais	II	III	IV	VI	VII	VIII
1	25,88	22,52	24,34	40,21	21,52	27,42
2	28,70	23,57	17,57	38,31	33,44	31,24
3	20,71	22,11	30,00	43,64	16,74	20,41
4	36,79	23,37	27,12	40,44	24,57	19,56
5	36,36	31,85	27,88	37,52	18,24	21,37
6	47,59	25,24	26,98	31,89	26,98	28,54
7	43,53	12,99	20,43	40,29	24,59	21,66

Tab. A46. Contagem absoluta (células / g de tecido) de linfócitos T – CD8 α nos fragmentos de baço e de auto-implante esplênico.

Animais	II	III	IV	VI	VII	VIII
1	179	36	12	233	65	121
2	53	11	33	144	204	127
3	131	27	22	149	40	120
4	112	7	13	89	101	27
5	113	2	29	115	21	69
6	170	5	19	93	84	61
7	161	16	15	82	36	45

Tab. A47. Contagem relativa (%) de linfócitos T-CD8 α nos fragmentos de baço e de auto-implante esplênico.

Animais	II	III	IV	VI	VII	VIII
1	31,87	18,41	15,95	23,51	25,32	18,47
2	18,40	16,37	20,42	18,66	26,15	24,49
3	24,27	20,92	15,28	20,96	22,18	26,65
4	18,27	15,92	20,28	24,79	16,04	14,98
5	18,20	13,19	20,22	19,27	24,03	27,41
6	27,48	13,37	14,60	17,26	23,32	12,54
7	25,27	28,45	15,87	8,99	18,74	17,99

Tab. A48. Contagem absoluta (células / g de tecido) de linfócitos T – CD8 β nos fragmentos de baço e de auto-implante esplênico.

Animais	II	III	IV	VI	VII	VIII
1	51	10	6	80	14	35
2	27	5	5	59	42	18
3	36	9	7	50	11	17
4	43	1	3	29	43	13
5	59	1	6	47	12	12
6	44	2	4	40	16	28
7	55	3	5	33	14	16

Tab. A49. Contagem relativa (%) de linfócitos T-CD8 β totais nos fragmentos de baço e de auto-implante esplênico.

Animais	II	III	IV	VI	VII	VIII
1	9,10	5,15	7,46	8,12	5,50	5,41
2	9,51	7,14	3,08	7,65	5,41	3,49
3	6,70	7,11	4,73	7,08	6,28	3,85
4	7,06	3,38	4,30	7,96	6,85	7,12
5	9,49	7,58	3,98	7,85	13,49	4,96
6	7,06	5,94	3,34	7,43	4,56	5,88
7	8,66	5,90	5,03	3,62	7,24	6,23

Tab. A50. Contagem absoluta (células / g de tecido) de linfócitos B de zona marginal do baço nos fragmentos de baço e de auto-implante esplênico.

Animais	II	III	IV	VI	VII	VIII
1	80	32	8	217	29	23
2	46	3	16	139	74	63
3	117	6	7	156	16	22
4	108	3	5	58	66	11
5	152	1	7	123	7	25
6	96	6	5	94	21	39
7	152	6	5	168	12	13

Tab. A51. Contagem relativa (%) de linfócitos B de zona marginal de baço nos fragmentos de baço e de auto-implante esplênico.

Animais	II	III	IV	VI	VII	VIII
1	14,20	16,46	11,12	21,87	11,45	3,50
2	15,96	4,71	10,23	17,95	9,49	12,12
3	21,66	4,80	4,85	21,88	8,75	4,98
4	17,58	6,27	7,13	16,09	10,55	6,24
5	24,37	5,93	5,01	20,55	7,45	10,15
6	15,54	16,27	4,13	17,46	5,87	8,14
7	23,79	10,92	5,90	18,54	6,31	5,21



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA ROBERTO ALCÂNTARA GOMES
COMISSÃO DE ÉTICA PARA O CUIDADO E USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº CEA/164/2006 sobre "Subpopulações linfocitárias em ratos submetidos à esplenectomia total isolada ou combinada com auto-implante esplênico e a suplementação dietética com L-glutamina" sob a responsabilidade de **Cristina Fajardo Diestel** está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética Para o Cuidado e Uso de Animais Experimentais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ (CEA), em **14/12/2006**. Este certificado expira em **14/12/2008**.

Rio de Janeiro, 14 de Dezembro de 2006.

Prof. Antonio Carlos da Silva
Coordenador – CEA/IBRAG/UERJ

Antonio Carlos da Silva
Prof. Adjunto - Mat. 4592-2
UERJ Inst. Biologia

