

JURANDIR MARCONDES RIBAS FILHO

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS NA VIGÊNCIA DE
PERITONITE AGUDA

ESTUDO EXPERIMENTAL EM RATOS

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná para obtenção do grau acadêmico de DOUTOR.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Bleggi Torres
Cordenador: Prof. Dr. Osvaldo Malafaia

CURITIBA
1994

Aos meus pais Jurandyr e Neusa,
pela história que me ensinaram a
viver.

À minha esposa Carmen,
pelo incansável apoio e
compreensão que somente
no amor encontramos

Aos meus filhos Gustavo e
Fernanda, que são a minha
grande alegria de viver.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. LUIZ FERNANDO BLEGGI TORRES, a quem devo a orientação desta tese, pela competência, apoio e incentivo, minha profunda e eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. OSVALDO MALAFAIA, Coordenador do Curso de Pós-Graduação, e amigo incondicional a quem devo a minha formação científica e a oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. GILTON A. GUILGEN, pela amizade, sempre gentil colaboração e idealização do modelo experimental.

Aos Profs. Drs. ALMYR E.C. CORTES e SERGIO BRENNER, meus mestres e colegas de magistério, pelas oportunidades que me proporcionaram e pelo privilégio do convívio.

Ao Prof. Dr. FERNANDO HINTZ GRECA, amigo e incentivador, pelas oportunas sugestões e auxílio, quando do início da Pós-Graduação.

À acadêmica LUCIA DE NORONHA, pelos relevantes auxílios na obtenção do material de histologia, assim como a orientação na descrição e análise do material fotográfico.

Aos acadêmicos REGINA CÉLIA ADUR, LUCIANA DE OLIVEIRA MARQUES, WILLIAM CESAR CAVAZANA e AURÍLIO L. DA SILVA, pela inestimável contribuição no preparo e obtenção do material de estudo.

À bióloga FADUA ALESSANDRA QUEIROZ e MARIA IOLANDA NEVES SANCHEZ, pela paciente colaboração e ensinamentos da metodologia de obtenção e preparo das peças para estudo por microscopia eletrônica.

Às Dras. LIBERA MARIA DALLA COSTA e HELENA HOMEM DE MELLO DE SOUZA, pelo extensivo estudo e obtenção do inóculo bacteriano reconhecendo aqui o autuismo de seus trabalhos.

Ao Prof. Dr. ANSELMO CHAVES NETO pela orientação nas análises e interpretações estatísticas.

Ao Dr. RICARDO KYRMSE, pela tradução dos artigos em alemão.

À bibliotecaria AUREA MARIA COSTIM, pela colaboração e orientação na obtenção das referências bibliográficas.

Aos senhores MARCELO T. MALAFAIA, MAURÍCIO T. MALAFAIA e RICARDO VON LINSINGER, pelas incansáveis horas dispendidas na editoração desta tese.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE GRÁFICOS	XI
RESUMO	XII
ABSTRACT	XIII
1.0 INTRODUÇÃO	2
2.0 REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1 Da produção de peritonite	6
2.2 Das alterações morfológicas celulares e teciduais	11
3.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1 Animais experimentais	19
3.2 Preparo do inóculo para a indução da peritonite com quantitativos e qualitativos bacterianos conhecidos	19
3.3 Técnica de inoculação da suspensão bacteriana	21
3.4 Observação clínica dos animais	21
3.5 Sacrifício, perfusão e fixação dos animais	22
3.6 Técnicas histológicas	24
3.7 Documentação fotográfica	27
3.8 Metodologia estatística	27
4.0 RESULTADOS	30
4.1 Avaliação clínica pós indução de peritonite	30
4.2 Variação ponderal	31
4.3 Alterações anátomo-patológicas viscerais dos animais do grupo controle	34

4.3.1 Fígado	34
4.3.2 Pulmão	34
4.3.3 Coração	34
4.4 Alterações anátomo-patológicas viscerais dos animais com peritonite	34
4.4.1 Peritônio diafragmático	35
4.4.2 Fígado	41
4.4.3 Baço	44
4.4.4 Pulmões	44
4.4.5 Coração	49
4.4.6 Pâncreas	49
5.0 DISCUSSÃO	52
5.1 Produção da peritonite	52
5.2 Alterações anátomo-patológicas viscerais	56
6.0 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Variação ponderal dos animais do Grupo A - Microscopia Óptica	32
TABELA 2 - Variação ponderal dos animais do Grupo B - Microscopia Eletrônica	32
TABELA 3 - Variação ponderal dos animais do Grupo C	32
TABELA 4 - Alterações histopatológicas do peritônio diafragmático	35
TABELA 5 - Alterações histopatológicas do fígado	41
TABELA 6 - Alterações histopatológicas dos pulmões	45

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Suspensões utilizadas para inoculação *Escherichia coli* e *Bacteroides fragilis*..... 20
- FIGURA 2 - Técnica de inoculação per-cutânea intra-peritoneal da suspensão..... 21
- FIGURA 3 - Anestesia do animal por inalação de éter sulfúrico ... 22
- FIGURA 4 - Animal em posição supina, fixado em suporte de cortiça, submetido à laparotomia e toracotomia 23
- FIGURA 5 - Punção cardíaca em ventrículo esquerdo com seringa contendo solução fixadora..... 23
- FIGURA 6 - Observação clínica do animal com halo preto ao redor dos olhos 30
- FIGURA 7 - Observação clínica do animal com piloereção 31
- FIGURA 8 - Corte histológico de diafragma (D), após 04 horas demonstrando extensa reação inflamatória em peritônio diafragmático (PD), com área focal de extensão intra-diafragmática (→), pleura diafragmática (PLD) sem alterações. 36
- FIGURA 9 - Demonstração de exsudato neutrofílico e infiltrado monocitário, envolvendo células mesoteliais hiperplasiadas (→). MA - Macrófagos 36
- FIGURA 10 - Corte ultraestrutural de peritônio diafragmático (D), após 02 horas, com macrófagos (MA), demonstrando início da resposta inflamatória..... 37

FIGURA 11 - Corte ultraestrutural de peritônio diafragmático após 12 horas, demonstrando macrófagos (MA), com vacúolos fagocíticos (V), contendo bactérias. Mitocôndria e retículo endoplasmático rugoso (RE) preservado.	38
FIGURA 12 - Corte ultraestrutural de peritônio diafragmático, após 12 horas, demonstrando célula mesotelial hiperplásica (ME), além de fibras musculares diafragmáticas (D).	39
FIGURA 13 A - Corte histológico de peritônio diafragmático, após 24 horas, demonstrando extensa reação inflamatória e mesotélio hiperplasiado.	40
FIGURA 13 B - Corte histológico de peritônio diafragmático, após 24 horas, com coloração de Gram, demonstrando, em meio a inúmeros neutrófilos, agregados de bactérias gram negativas (→).	40
FIGURA 14 - Corte histológico de fígado, após 02 horas, demonstrando veia centro-lobular (VCL), com cordões hepatocíticos preservados e mínimo exsudato neutrofílico sinusoidal (→).	42
FIGURA 15 - Corte histológico de fígado, após 08 horas, demonstrando microabscessos, com ocasionais hepatócitos necróticos (→).	42
FIGURA 16 - Corte histológico de peritônio visceral hepático, após 08 horas, demonstrando peritonite capsular hepática focal (→). ...	43
FIGURA 17 - Corte histológico de fígado, após 24 horas, demonstrando micro-abscessos, provocando destruição de cordões hepatocíticos e colapso da estrutura hepática com discreta fibrose reacional.	43
FIGURA 18 - Corte histológico de pulmão, após 02 horas, demonstrando septos, alveolares com mínima exsudação neutrofílica (→).	45
FIGURA 19 A - Corte histológico de pulmão, após 04 horas, demonstrando extenso foco bronco-pneumônico (*), com envolvimento da superfície pleural (→).	46

FIGURA 19 B - Corte histológico de pulmão após 04 horas, onde se observa detalhe do exsudato neutrofilico intenso, com restos celulares de fibrina (→) de permeio.	46
FIGURA 20 A - Corte histológico de pulmão, após 08 horas, demonstrando foco bronco-pneumônico (*), com moderado espessamento de septos alveolares (→), às custas de neutrófilos e monócitos.	47
FIGURA 20 B - Corte histológico de pulmão, após 08 horas, demonstrando-se espessamento de septos alveolares por células inflamatórias (→).	47
FIGURA 21 - Corte histológico de pulmão, após 12 horas, demonstrando pneumonia intersticial (→).	48
FIGURA 22 - Corte histológico de pulmão , após 24 horas, demonstrando estrutura preservada com pequena resposta inflamatória.	48
FIGURA 23 - Corte histológico de coração, após 12 horas, não demonstrando alterações histopatológicas.	49
FIGURA 24 A - Corte histológico de gordura peripancreática, após 08 horas, apresentando na fig. A: múltiplos microabscessos (→). FIGURA 24 B, detalhe de exsudato neutrofilico e macrófago (→).	50

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - Premissa de Gaussianidade para o Grupo A33

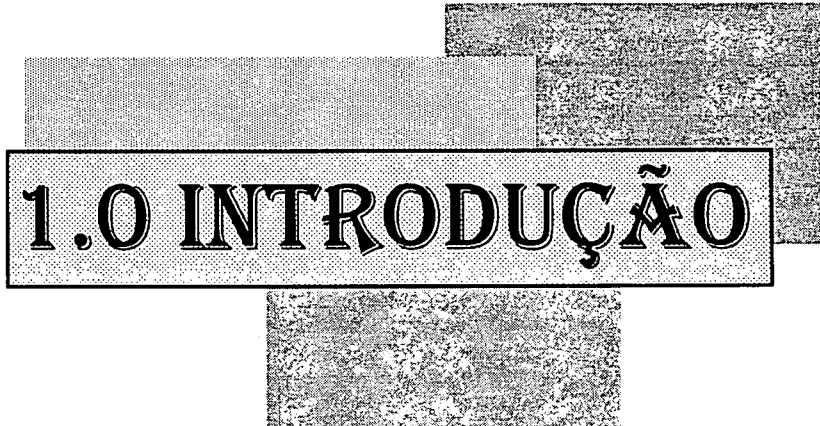
GRÁFICO 2 - Premissa de Gaussianidade para o Grupo B33

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi analisar as alterações morfológicas das vísceras abdominais e torácicas na peritonite experimental aguda. Trinta e oito ratos da raça Wistar, com peso entre 125 e 224 g foram estudados. Para a indução da peritonite experimental usou-se inóculo bacteriano constituído de suspensão a $2,8 \times 10^9$ UFC/ml de *Escherichia coli* e $1,33 \times 10^9$ UFC/ml de *Bacteroides fragilis*. Os animais foram divididos em 3 grupos: grupo controle, com 8 animais, onde injetou-se solução de cloreto de sódio a 0,9% ou meio de cultura; grupos A e B, com 30 animais, onde o inóculo bacteriano foi injetado, para posterior estudo histológico sob microscopia óptica e eletrônica respectivamente. Sob anestesia inalatória com éter sulfúrico os animais foram sacrificados em intervalos pré-determinados, através de punção intracardíaca e posterior injeção de solução fixadora. Após a fixação, as vísceras abdominais e torácicas foram cuidadosamente retiradas para o estudo histopatológico. Alterações clínicas importantes bem como variação ponderal estatisticamente significativa foram observadas nos animais com sepse. Estas alterações não foram evidenciadas no grupo controle. Nos animais infectados as alterações histopatológicas no fígado variaram desde discreta hiperplasia mesotelial até focos de abscesso intra-hepático, com destruição e necrose tecidual. Estas lesões foram mais evidentes após 8 horas da indução. O autor conclui ainda que o peritônio diafragmático apresentou, à microscopia óptica, desde discreta hiperplasia mesotelial até infiltração de neutrófilos com deposição de fibrina. Macrófagos com vacúolos fagocíticos contendo bactérias foram observados por microscopia eletrônica numa fase mais avançada da infecção.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the morphological changes in the thoracic and abdominal viscus after the induction of peritonitis. All the experiments were performed upon 38 Wistar rats, weighing between 125 and 224 g. The peritonitis was induced through an injection of a pool of bacteria inoculum, containing $2,8 \times 10^9$ UFC/ml of *Escherichia coli* and $1,39 \times 10^9$ UFC/ml of *Bacteroides fragilis*. The animals were allocated in 3 different groups. In the control group, with 8 rats, only saline solution or culture medium was injected. In the remaining animals, A and B group, the inoculum was injected in the peritoneal cavity for further histological study under optical and electron microscopy respectively. Under ether anesthesia, the animals were sacrificed in pre determined intervals through cardiac puncture followed by injection of a fixative solution. The abdominal and thoracic viscus were then removed for the histopathological study. Clinical changes, as well as significant weight loss was observed in the animals with sepsis. Their histopathological changes varied since mild mesothelial hiperplasia till micro intrahepatic abscess, with areas of liver necrosis. These lesions were more pronounced 8 hours after the induction of peritonitis. The author concludes that, under optical microscopy, the diaphragmatic peritoneum showed since mild mesothelial hiperplasia till neutrophils infiltration with fibrin deposit. Phagocytes macrophages with bacteria in their vacuoles were seen in a later phase of the infection, under electron microscopy.



1.0 INTRODUÇÃO

1.0 INTRODUÇÃO

As peritonites representam uma das entidades mais comuns nas cirurgias abdominais, principalmente nas de emergência (AZEVEDO et al., 1978), onde a contaminação do peritônio é uma possibilidade sempre considerada, e que desencadeia diferentes estados de morbidade e mortalidade. Uma vez instalada, todo caso de peritonite, qualquer que seja a sua causa desencadeia uma série de respostas envolvendo a membrana peritoneal, o intestino e os compartimentos líquidos orgânicos, que por sua vez produzem respostas secundárias ao nível endócrino, cardíaco, respiratório, renal e metabólico. Em determinadas formas de peritonite, em especial na supurativa aguda, ocorrem também outras respostas, estas devido à infecção.

As peritonites são classificadas em primária e secundária. A peritonite secundária é subdividida em peritonite supurativa aguda, peritonite química e peritonite granulomatosa (DAVIS, 1967); constituindo-se a peritonite aguda como a responsável pela metade de todos os casos de choque séptico fatal.

A peritonite primária ou espontânea, é uma peritonite bacteriana difusa, sem qualquer origem de infecção intra-abdominal aparente, sendo sua incidência rara e caracterizada por infecção monomicrobiana. Não se conhece, até hoje, a via pela qual os microorganismos são transmitidos para a cavidade peritoneal admitindo-se porém como hipótese mais provável, a disseminação hematogênica ou, mais recentemente, a translocação visceral de bactérias (FOWLER, 1971).

A peritonite supurativa aguda, constitui-se na forma mais freqüente de peritonite em seres humanos resultando geralmente da ruptura de uma víscera abdominal, o que permite a contaminação da cavidade peritoneal.

A peritonite química ou asséptica, ocorre quando materiais irritantes entram na cavidade peritoneal. Os mais freqüentes causadores deste tipo de peritonite são o suco gástrico, suco pancreático, bile, urina, sangue e mecônio (DAVIS, 1967). Já a peritonite granulomatosa corresponde ao grupo de doenças caracterizadas por reação peritoneal e formação de granulomas. Pode ser causada por vários microorganismos e outros agentes não microbianos sendo os mais freqüentes bacilo de Koch, contaminação por talco e outros.

A busca de modelo experimental que se assemelhe à peritonite ocorrida no homem (ONDERDONK et al., 1975; BARTLETT et al., 1978; MATLOW et al., 1989), promoveu inúmeros estudos envolvendo diferentes técnicas de irritação peritoneal incluindo contaminação fecal, lesão intestinal, injeção de substâncias químicas irritativas e colônias bacterianas.

Evidências experimentais também indicam que a flora fecal mista que em geral é encontrada na peritonite atua de maneira sinérgica, de tal forma que a virulência total é superior à soma de suas partes. Assim experimentalmente, a injeção de numerosas bactérias de uma espécie de patógenos fecais pode não resultar em morte. Por outro lado, associações entre aeróbios e anaeróbios podem resultar em peritonite de proporções alarmantes, culminando em óbito.

Estudos experimentais indicam ainda que os microorganismos aeróbios conseguem aumentar a virulência dos anaeróbios reduzindo o potencial redox e elaborando nutrientes essenciais, ao passo que os microorganismos anaeróbios aumentam a virulência dos patógenos aeróbios elaborando enzimas que destroem os antibióticos.

O moderno tratamento aberto da peritonite (peritoneostomia) (KERN et al., 1983; JONECKO et al., 1989) permite hoje em dia novas possibilidades de acompanhamento da morfologia da irritação peritoneal por exames seriados de fragmentos cirúrgicos. Entretanto a limitação ética no manuseio do *anima nobili* e as dificuldades no desenvolvimento e controle dos modelos experimentais fazem com que poucos trabalhos da literatura nacional e internacional relatem as alterações microscópicas na vigência da peritonite, induzida por inóculo bacteriano conhecido.

INTRODUÇÃO

O objetivo fundamental deste trabalho, baseados em um modelo padronizado no Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, dentro da linha de pesquisas de infecção em cirurgia visa, à luz da microscopia óptica e eletrônica, estudar as alterações morfológicas de vísceras abdominais e torácicas na vigência da infecção peritoneal.



2.0 REVISÃO DA LITERATURA

2.0 REVISÃO DA LITERATURA

Na revisão da literatura procurou-se manter a mesma terminologia utilizada pelos autores em seus respectivos trabalhos e obras, sendo referidos de maneira não separada tanto os assuntos oriundos de periódicos como livros. Porém serão separados os temas pertinentes à produção experimental de peritonite daqueles que dizem respeito às alterações morfológicas dos diferentes elementos celulares e teciduais, mantendo-se sempre a ordem cronológica de suas publicações.

2.1 DA PRODUÇÃO DE PERITONITE

BURNET et al. (1957) realizaram trabalho experimental com porcos da Índia, por serem de fácil manuseio e apresentarem maior suscetibilidade à infecção bacteriana do que à dos ratos. Os autores induziram peritonite fecal através da retirada de uma pequena elipse (3mm) da parede do cólon. A peritonite difusa desencadeada causou a morte de 17 dos 20 animais (85%). Os animais foram divididos em 6 grupos, tendo sido daí submetidos a diferentes tipos de tratamento.

CROOK et al. (1968) apresentaram um modelo experimental de peritonite em 94 cães, ligando-se o apêndice cecal e, desta maneira, interrompendo seu suprimento sanguíneo. A taxa de mortalidade nos animais não tratados foi de 78%.

ROSSATO et al. (1971) apresentaram um trabalho experimental em 41 cães submetidos à indução de peritonite através da secção de um segmento ileal. Houve 100% de mortalidade nos 15 cães que receberam somente solução salina intravenosa.

SHARBAUGH et al. (1971) desenvolveram um modelo produzindo peritonite em cães através de uma suspensão fecal a 25% estéril (preparada com fezes dos próprios cães) associada à concentração estandarizada de *Escherichia coli*, *Pseudomonas Aeroginosa* ou uma mistura de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, *Klebsiella* e *Aerobacter*. O grupo controle recebeu apenas suspensão fecal estéril, sendo que todos os cães sobreviveram e apenas um apresentou-se letárgico nas primeiras 24 horas. Já com a mistura da suspensão estéril de fezes associada aos microorganismos referidos produziu-se peritonite fatal com efeitos locais e sistêmicos. Este método tem as vantagens de simular muitas das formas naturais de peritonite. Além disto, com a utilização de inóculo estandarizado, a composição bacteriana é possível de ser conhecida. Tal método pode ser útil para avaliação da eficácia dos vários regimes terapêuticos como também permite a investigação dos efeitos produzidos quer por uma única bactéria quer por diferentes espécies nas causas de peritonite fecal.

SISEL et al. (1972) apresentaram estudos em coelhos nos quais a ruptura colônica experimental por enema de sulfato de bário ou água era seguida de reparo cirúrgico e lavagem peritoneal. No grupo de animais onde a peritonite foi oriunda da mistura de fezes com sulfato de bário houve 10% de sobrevida, ao contrário do grupo em que infecção peritoneal deveu-se à mistura de fezes com água com 50% de sobrevida.

WEINSTEIN et al. (1975) apresentaram um modelo experimental para produção de peritonite, através da inoculação de fezes retiradas do ceco de 15 ratos e diluídas em uma solução de glicose peptona fermentada, e misturada a sulfato de bário a 10%. Esta preparação era realizada em câmara anaeróbica, frações resfriadas com nitrogênio líquido e estocadas a 40° centígrados até o seu uso. A inoculação era realizada através de uma laparotomia mediana de mais ou menos 1,4 cm, por onde se instalava uma cápsula estéril de gelatina, contendo 0,5 ml do inóculo. Este estudo sugere que os coliformes causaram mortalidade precoce e os anaeróbios foram responsáveis pela formação dos abscessos intra-cavitários.

ONDERDONK et al. (1976) demonstraram peritonite intra-abdominal, em ratos Wistar, com o uso de quatro espécies microbianas: *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Bacteroides fragilis* e *Fusobacterium varium*. Estas bactérias foram inoculadas dentro da cavidade peritoneal em separado e em todas as combinações possíveis (pares). Foram observadas a taxa de mortalidade e a incidência de abscesso intra-peritoneal na autópsia, após o sétimo dia. A mortalidade foi restrita aos

ratos inoculados com *Escherichia coli*, implicando, desta maneira, os coliformes na letalidade desse modelo experimental. Abscessos intra-abdominais foram produzidos em 94% dos ratos que receberam a combinação de uma bactéria anaeróbica, um microorganismo facultativo. Não houve a formação de abscessos quando da inoculação única de qualquer bactéria. Estes resultados sugerem que a formação de abscessos intra-abdominais é estabelecida pelo sinergismo entre anaeróbios e bactéria facultativa.

BROWNE et al. (1976) apresentaram, em seu trabalho, um modelo de produção de peritonite em ratos com inoculação de culturas de bactérias aeróbicas, anaeróbicas e associação de ambas. O autor comprova a eficácia da produção de peritonite com culturas bacterianas e tece considerações a respeito dos três principais modos de se produzir um modelo experimental, ou seja, através de técnica cirúrgica de desvascularização de alça intestinal, inoculação de conteúdo fecal e de cultura pura de bactérias. Finalizando, discorrem sobre as inúmeras desvantagens dos dois primeiros métodos e concluem ser o último, o ideal, embora não reproduzindo fidedignamente a peritonite humana, por oferecem uma técnica mais facilmente reproduzível, mais econômica, podendo ainda realizar estudos em quantidade estatisticamente mais significativa.

NICHOLS et al. (1978) apresentaram um modelo experimental em ratos (Sprague-Dawley) para produção de peritonite através de fezes humanas frescas. O material fecal foi misturado com sulfato de bário e colocado em caixa anaeróbica, colocada em cápsulas de gelatina, sendo introduzida na cavidade peritoneal cirurgicamente. Foi implantada quantidade variável de cápsulas e analisada a sobrevivência dos ratos. Os autores concluem que o modelo é econômico para a produção de sepse, cuja intensidade é diretamente proporcional à quantidade de inóculo introduzido. Sugerem que ele reproduz a peritonite humana e que é adequado para avaliar a eficácia dos vários antibióticos utilizados no tratamento da sepse intra-abdominal.

STEWART et al. (1978) apresentaram modelo experimental de peritonite em ratos. Foi ela produzida através de inoculação de suspensão de fezes de ratos, homogeneizadas em caldo nutriente e filtrados através de gazes cirúrgicas. Eram guardadas em recipiente universal a 25° C, e quando requeridas eram aquecidas em banho-maria a 37° C e injetadas intra-peritonealmente, com seringas esterilizadas.

BARTLETT et al. (1978) apresentaram um modelo experimental de peritonite, em ratos Wistar, provocado com introdução intra-peritoneal de cápsulas gelatinosas contendo material fecal proveniente de ratos. Este estudo foi realizado para determinar o papel das várias espécies microbianas. Os ratos inoculados desenvolveram uma doença bifásica, inicialmente com peritonite aguda por *Escherichia coli*, com alta mortalidade. Os ratos que sobreviveram a este estágio desenvolveram abscessos intra-peritoneais, sendo anaeróbias, as bactérias preponderantes.

SAAD (1984) desenvolveu um modelo experimental de infecção peritoneal, em 24 ratos Wistar. Dividiu os animais em dois grupos; grupo A (grupo controle) com 12 animais, em que se inoculou soro fisiológico na cavidade peritoneal; grupo B constituído de 12 ratos, em que se inoculou 1 ml da suspensão de conteúdo colônico diluído com soro fisiológico, para cada 100 gramas do seu peso, na cavidade peritoneal. A suspensão do conteúdo colônico era obtida de um único rato submetido à laparotomia, do qual retirava-se todo o conteúdo fecal. Os resultados são analisados, observando-se a mortalidade, a evolução ponderal, os valores da proteína C reativa e os aspectos anátomo-patológicos. A análise dos resultados sugere que o modelo proposto pode simular a fase aguda da infecção peritoneal.

ROCHA (1986) desenvolveu um modelo experimental de introdução de peritonite em 20 cobaias. A contaminação abdominal foi feita através de injeção intra-peritoneal de homogeneizado de fezes humanas. Os resultados foram avaliados pela taxa de mortalidade, pelos achados microbiológicos do homogeneizado de fezes e do líquido peritoneal dos animais e pelos aspectos macroscópicos da cavidade abdominal durante a necrópsia. Concluiu que o modelo experimental foi capaz de produzir peritonite difusa grave, com flora polimicrobiana e óbito em 100% das cobaias em menos de 24 horas.

MATLOW et al. (1989) estudaram a patogenicidade de *Streptococcus faecalis* em peritonite fecal em ratos. Inocularam *Escherichia coli*, *Bacteroides fragilis* e *Clostridium perfringens* com ou sem *Streptococcus faecalis*, associados a sulfato de bário. Analisaram a mortalidade e as características do abscesso intra-abdominal. Concluíram que a presença de *Streptococcus faecalis* no inóculo original era associado à mortalidade e à formação de extensos abscessos. O *Streptococcus faecalis* fez sinergismo com outras bactérias na sepse intra-abdominal, aumentando a morbidade e, possivelmente, a mortalidade.

FREIRE et al. (1989) apresentaram estudo experimental de infecção intra-peritoneal em ratos, com o objetivo de formação de abscessos, usando-se duas espécies bacterianas: *Escherichia coli* e *Bacteroides fragilis*. Para a realização do trabalho utilizaram 50 ratos albinos com peso variando entre 140 a 180 gramas. Os abscessos foram confirmados fazendo-se a análise bacteriológica e histopatológica. Os autores concluíram que o modelo usado é eficaz em 100% das vezes para produzir abscesso.

FREIRE et al. (1989) apresentaram um outro método de produzir abscessos intra-peritoneais em ratos, com vistas a sua aplicação em estudos da área de infecção. Provocou-se a infecção mediante a utilização de um modelo que consistia na colocação de cápsula dupla de gelatina + sulfato de bário + conteúdo colônico autoclavado + cultura de *Escherichia coli* + cultura de *Bacteroides fragilis*. Para o desenvolvimento do trabalho foram estudados 17 ratos Wistar, albinos machos, que foram sacrificados no 7º, 14º, 21º, 50º, 90º dias após provocar-se a formação do abscesso. Na dissecação e abertura dos abscessos, semeou-se a secreção encontrada em placas de Mc Conkey e em meio seletivo para anaerobiose. As placas de Mc Conkey ficaram em estufa a 37º C por 24 horas e as do meio seletivo para anaeróbio, por 48 horas. Após este período o material encontrado no meio de anaerobiose foi novamente semeado em placas de Mc Conkey para identificação da bactéria. Observou-se, em todas as placas, crescimento de *Escherichia coli* e *Bacteroides fragilis*, confirmando assim, uma infecção ainda presente e de forma bastante ativa, até o 90º dia. Concluem os autores que este modelo foi eficaz para provocar abscessos crônicos, com isolamento dos germes inoculados em 100% dos animais.

LOPES et al. (1993) relatam a dificuldade de se reproduzir a peritonite bacteriana utilizando-se culturas puras. Eles entendem serem outros fatores necessários para a gênese da peritonite, tais como; hemoglobina, bile, secreção pancreática. Classificam ainda os autores as peritonites em Primária, Secundária, Terciária e Abscessos Intra-Abdominais, conceituando as peritonites terciárias como um quadro de infecção abdominal difusa, persistente, instalada devido a incompetência dos mecanismos de defesa do hospedeiro e/ou infecções superpostas.

2.2 DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS CELULARES E TECIDUAIS

CAMERON et al. (1957), estudando ferimentos tangenciais de fígado, realizados experimentalmente, observaram ilhas de proliferação de células de superfície, concluindo que elas eram células mesoteliais as quais tinham se tornado separadas das áreas adjacentes do peritônio, conclusão esta sustentada por outros autores como CURRAN et al. (1964).

NORTH et al. (1963), em estudos com ratos, através da microscopia eletrônica realizaram observações em macrófagos peritoneais dos animais normais e naqueles imunizados com *listeria monocitogenes*. O material foi obtido através da injeção intra-peritoneal de um inóculo contendo uma suspensão bacteriana de 10^7 (Solução de Hank). Os autores detalharam nesta pesquisa, a ultraestrutura dos macrófagos incluindo membrana citoplasmática, citoplasma, núcleo, retículo endoplasmático e mitocôndrias, demonstrando também a participação nos estágios iniciais das vesículas citoplasmáticas em resposta à presença da bactéria ingerida. Em trabalho subsequente relataram a evolução do processo com a lise de macrófagos como resultado de uma rápida multiplicação intracelular da bactéria.

HARD et al. (1966) realizaram estudos mostrando as alterações morfológicas nos macrófagos peritoneais de ratos, após injeção de suspensão virulenta obtida através de *corynebacterium ovis* de ovelha; na pesquisa os autores demonstraram os vários estágios desde 05 minutos, 06 horas, 20 horas, 02, 03, 04 dias, após injeção intracavitária do inóculo. Os achados encontrados nestas células foram caracterizados por um aumento em tamanho e número de polirribossomas, acentuado desenvolvimento do retículo endoplasmático granular, e hipertrofia do aparelho de Golgi assim como um aumento do tamanho e número dos lisossomas, quando comparados com os macrófagos não estimulados; Ainda neste estudo os autores não demonstraram grandes modificações de projeções citoplasmáticas e não observaram aumento do número de mitocôndrias.

ESKELAND et al. (1966), no Instituto de Patologia da Universidade de Oslo, estudaram a regeneração do peritônio parietal em ratos adultos machos, após realizarem fendas em diversos tamanhos no peritônio parietal dos animais. No presente trabalho os autores demonstram através da microscopia eletrônica a morfologia normal do peritônio parietal do rato, assim como as alterações celulares ocorridas

nos diversos períodos após a realização da lesão peritoneal; O estudo demonstra claramente as modificações progressivas das organelas intracelulares até a regeneração do peritônio, ocorrida após o oitavo dia do início do experimento.

SUTTON et al. (1966), através de estudos de microscopia eletrônica, detalharam muito bem as modificações ultraestruturais no curso da transformação de monócitos em macrófagos, os quais, nos tecidos inflamados contêm, invariavelmente, inclusões fagocíticas (FAGOSSOMOS), que englobam bactérias, detritos celulares e resíduos lipídicos. Acreditam ainda os autores que as células gigantes multinucleadas, que ocorrem no local da inflamação diante de um corpo estranho, sejam formadas pela coalescência de macrófagos.

HENDRY et al. (1966) estudaram dois grupos de 12 ratos brancos, pesando aproximadamente 300 gramas, inoculando intraperitonealmente, nos mesmos, uma mistura letal de *Escherichia coli* e hemoglobina.

Os autores demonstraram as alterações morfológicas, hematológicas e bioquímicas ocorridas durante o curso da peritonite. A necrose foi vista ocasionalmente no rim, intestino e miocárdio, não sendo, porém, encontrada supuração na cavidade peritoneal. Necrose de tecido linfático foi também visto no baço, linfonodos, intestinos e timo. O órgão mais notadamente afetado foi o fígado, sendo estas alterações evidentes após 4 horas. Em relação aos parâmetros bioquímicos, os estudos revelaram um decréscimo gradual na fosfatase ácida e um aumento na fosfatase alcalina, assim como uma elevação gradual de transaminases e fibrinogênio.

WATTERS et al. (1972) pesquisaram através de estudos por microscopia eletrônica a regeneração do mesotélio de ratos fêmeas "Sprague-Dawley". Os autores estabeleceram um procedimento operatório no qual era removido do animal, após laparotomia mediana, uma área de mesotélio, sendo que o tecido conectivo e os vasos subjacentes não eram danificados. Os resultados destes estudos sustentam a teoria de que a regeneração do mesotélio ocorre através da aderência de células do fluido peritoneal, as quais, ainda que esféricas no início, posteriormente tornam-se aplanadas, desenvolvendo microvilosidades similares àquelas do mesotélio normal dos ratos.

RYAN et al. (1973), utilizando-se de ratos Wistar machos, pesando de 100 a 200 gramas, induziram secagem e lavagem do peritônio

visceral destes animais com ar comprimido e solução salina isotônica, por 30 minutos. Descreveram os efeitos citológicos, na presença destes traumas, através de estudos ultraestruturais. O trabalho ilustra ainda, através de fotomicrografias, as diversas alterações produzidas desde o início das lesões e durante todo o curso de regeneração mesotelial. Notou-se que, no sétimo dia após o início do processo, o mesotélio encontrado era similar ao normal.

RAFTERY (1973), em estudo por microscopia óptica e eletrônica, em ratos machos da linhagem Sprague-Dawley, demonstrou que a regeneração do peritônio ocorre mais rapidamente em animais mais jovens e que a formação de um novo mesotélio surge das células do tecido conectivo subperitoneal, não sendo possível determinar se estas células são mesenquimais primitivas ou fibroblastos.

CHIN et al. (1974) estudaram células peritoneais de camundongo, a intervalos de 06 horas e 30 dias, seguidos de injeção intravenosa de uma dose sub letal de ciclofosfamida. Com auxílio da microscopia eletrônica, evidenciaram danos e morte de um grande número de células, no intervalo compreendido entre 06 e 12 horas, sendo a maioria das células os linfócitos, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos. Os macrófagos exibiam todos os estágios de fagocitose e digestão. Após 24 horas, a maioria das células mortas situavam-se dentro do citoplasma dos macrófagos. Após 06 dias, as células peritoneais danificadas tinham reconquistado a aparência normal entretanto, a proporção de células linfóides era ainda reduzida. Após o 18º dia, todos os achados eram indistinguíveis do normal.

Os mesmos autores, em 1970, já haviam estudado e demonstrado estes fenomenos nas células linforeticulares das placas de Peyer.

MC CALLUM et al. (1982) realizaram estudos histopatológicos em espécimens de fígado e baço de ratos, após infecção promovida por injeção intra-peritoneal com 5×10^8 / ml de *Bacteroides melaninogenicus* e 5×10^8 / ml *Fusobacterium necrophorum*. Os autores realizaram estudos a intervalos de 12 horas até seis semanas após inoculação bacteriana. Estes estudos demonstraram que a maior taxa de mortalidade (25 a 30%) ocorreu entre as primeiras 24 a 48 horas, com os animais mostrando evidentes sinais de septicemia aguda. Os autores relatam que, do ponto de vista histológico, acúmulo de células inflamatórias agudas foi notado em tecidos, após 12 horas de infecção.

SANTOS et al. (1983), após estudos de macrófagos peritoneais obtidos de camundongos suíços normais e de idênticos animais injetados com 01 ml de tioglicolato a 3%, observaram, através de microscopia eletrônica, diferenças entre os componentes de ambas as células. No presente trabalho os autores demonstraram que o macrófago residente apresentava um grande número de pequenos vacúolos localizados principalmente na periferia das células, já os outros apresentavam um pequeno número de grandes vacúolos. Quanto às organelas como; mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, as mesmas, nos macrófagos residentes, eram encontradas ao redor do núcleo, diferentemente dos outros macrófagos, onde, estas organelas, eram distribuídas por todas as partes da célula. Ainda em relação à superfície celular, os macrófagos residentes apresentavam projeções (evaginações) curtas e em grande número, ao contrário dos outros os quais apresentavam projeções longas porém em pequena quantidade.

CANFIELD (1986) apresentou um caso de peritonite nodular em "Koala" (*Phascolarctos cinereus*); o autor realizou, entre outros, estudos histológicos da superfície serosa peritoneal. À microscopia óptica, os cortes corados com HE mostraram uma base de tecido conectivo denso contendo células inflamatórias mononucleares disseminadas, e uma região superficial de fibroblastos, macrófagos e linfócitos bem dispersados. O trabalho apresenta ainda áreas de hemorragia recente e antiga logo abaixo da camada celular mesotelial proeminente.

FOTEV et al. (1987), investigando a função dos macrófagos na cicatrização do mesotélio em ratos Wistar, machos, sugerem que, depois do ferimento no mesotélio e após o aparecimento de exsudato de macrófagos acumulados no local, estas células secretam fator mitogênico que induz à proliferação de células mesoteliais adjacentes à ferida e na sua superfície oposta. Subseqüentemente, células derivadas caem dentro da ferida serosa e células mesoteliais, da extremidade da ferida, migram para o centro e rapidamente reparam o defeito. Esta hipótese é parcialmente defendida porque, após o ferimento do mesotélio peritoneal, a resposta proliferativa das células mesoteliais vizinhas atingem elevado nível em 2 dias, coincidindo com o tempo em que os macrófagos atingem sua maior concentração no exsudato da ferida.

ALMDAHL et al. (1987) estudaram a eficácia do tratamento com glucagon aminado semi-solúvel (s.a.g.) e células mononucleares peritoneais de ratos doadores em dois modelos separados de peritonites, provocados por suspensão com *Escherichia coli* e por perfuração cecal. Os autores concluíram que, em ambas as formas, houve a eficácia do tratamento pelo s. a. g., bem caracterizado, quando comparado com o

tratamento realizado com a injeção de células provenientes de ratos tratados com solução salina (grupo controle); os estudos indicam que o efeito protetor é mediado principalmente pela ativação dos macrófagos. Demonstram ainda os autores, através da microscopia eletrônica, o envolvimento bacteriano pelos macrófagos nos grupos de animais tratados com s. a. g. .

POGGETI et al. (1988) descreveram o peritônio como uma membrana formada por células de origem mesotelial que ocupa extensa área na cavidade abdominal, com grande poder de transudação, absorção, exsudação e cicatrização. Relatam os autores que, quando agredido por bactérias, sofre grande exsudação plasmática, que permite a opsonização de bactérias, provoca quimiotaxia de polimorfonucleares neutrófilos e desenvolve o processo de formação de fibrina. A fagocitose e a circunscrição do processo, pela fibrina, permitem o combate e morte de bactérias. Comentam ainda os autores que, ao nível dos diafragmas, há a passagem de partículas e bactérias ao sistema linfático para ulterior ação do sistema retículo-endotelial; concluem que, se o processo foi eficiente, haverá cura porém, se assumir característica evolutiva, poderá levar ao choque e toxemia.

ANDERSON et al. (1989) estudaram um modelo experimental de peritonite em ratos para investigar se a bile dentro da cavidade abdominal muda a expressão morfológica da peritonite. Os ratos receberam injeção intra-peritoneal de solução salina, bile e *Escherichia coli* em grupos distintos. Após sacrifícios, foram retirados segmentos de peritônio parietal e visceral, e examinados à microscopia óptica e eletrônica. A bile sozinha aumentou o número de células inflamatórias, especialmente monócitos. A *Escherichia coli* sozinha determinou um aumento menos pronunciado de células inflamatórias. Quando da associação de ambas (bile e *Escherichia coli*) ocorreu um aumento mais significativo do número de células inflamatórias. Concluíram que os efeitos inflamatórios da *Escherichia coli* foram muito realçados pela presença da bile.

FUKASAWA et al. (1990), em estudo da regulação da proliferação das células reprodutoras do tecido peritoneal por macrófagos peritoneais, feito em coelhos de linhagem NEW ZEALAND, fêmeas, brancos, sugerem que, após cirurgia, os macrófagos podem alterar a composição dos seus produtos secretores e, inicialmente, têm diferenciação modulada do TRF (fibroblasto reparador de tecidos) para produzir matriz extracelular.

MANENTI et al. (1990) estudaram 24 ratos pesando aproximadamente 200 gramas, nos quais foram induzidos peritonite pela técnica de Wichterman et al., sendo os mesmos sacrificados 06, 12 e 18 horas após o início do experimento. As conclusões observadas pelos autores foram de que, durante a peritonite aguda experimental, a principal lesão histológica no fígado era representada pela estase na veia centrolobular e acúmulo intracitoplasmático de triglicérides nos hepatócitos e, ainda, pela ativação e hipertrofia das células de Kupffer.

DAYAL et al. (1991) descreveram que a peritonite pode ser devida tanto a uma invasão bacteriana quanto a uma irritação química; relatam também que a peritonite bacteriana é quase invariavelmente secundária à extensão de bactérias através da parede de uma víscera oca ou à ruptura de uma víscera. Dependendo da duração da peritonite, comentam os autores, as membranas mostram as seguintes alterações: Cerca de 2 a 4 horas após o insulto, observa-se perda de qualidade cinzenta e brilhante da superfície peritoneal, que se torna fosca e sem brilho. Ao mesmo tempo, observa-se pequeno acúmulo de líquido essencialmente seroso ou ligeiramente turvo. Subseqüentemente o exsudato torna-se cremoso e obviamente supurativo. Relatam ainda os autores que o processo inflamatório é típico de uma infecção bacteriana aguda em qualquer outro local, produzindo a reposta neutrofílica característica com exsudação fibrinopurulenta.

SILVA (1991) descreveu que entre as tarefas executadas pelos macrófagos no tecido conjuntivo estão a eliminação de certos tipos de microorganismos infecciosos, assim como a remoção de detritos celulares resultantes da reação inflamatória aguda que segue à infecção, como por exemplo as peritonites bacterianas; no processo de fagocitose, as partículas englobadas passam para o citoplasma em fagossomas, que, então, se fundem com lisossomas primários. As enzimas hidrolíticas destes lisossomas atacam e degradam as macromoléculas orgânicas presentes no material ingerido. Relatam os autores que, quando vistos na microscopia eletrônica, os macrófagos manifestam tipicamente material fagocitado presente em fagossomas; algumas cisternas de retículo endoplasmático rugoso e um aparelho de Golgi proeminente estão presentes; em geral a superfície dos macrófagos tem um aspecto irregular em virtude da presença de pseudópodos, pregas da superfície e microvilosidades.

MANENTI et al. (1991) estudaram 30 ratos, pesando aproximadamente 200 gramas, dividindo-os em 3 grupos de 10 animais; em 8 ratos de cada grupo, era induzido peritonite pela técnica de

WICHTERMANN et al., e, nos 2 restantes, realizado apenas laparotomia. Os animais foram sacrificados respectivamente após 6, 12 e 18 horas após o início do experimento. Após observações microscópicas e macroscópicas, os autores encontraram nos animais septicêmicos de todos os grupos uma intensa atividade macrofágica no Baço e Linfonodos Abdominais, porém nos Pulmões e Timo estas alterações não foram observadas. Ainda em relação aos animais infectados tanto mais intensa era a atividade macrofágica quanto maior o tempo de infecção, bem demonstrando o importante papel destes órgãos (Baço e Linfonodos) no combate das sepse.



3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Centro de Pesquisa do Curso de Pós Graduação em Clínica Cirúrgica e no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná com apoio do Biotério do Instituto de Tecnologia do Paraná - TECPAR - e Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná.

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Utilizou-se 38 ratos Wistar, adultos, fêmeas provenientes do Instituto de Tecnologia do Paraná, com peso variando de 125 a 224 gramas divididos em 3 grupos: grupo A (n=15) onde após a indução da peritonite pela injeção de inóculo bacteriano procedeu-se estudos por microscopia óptica de vísceras tóraco-abdominais; grupo B (n=15) onde a peritonite foi estudada por microscopia eletrônica e grupo C (n=8) composto por animais controles, sendo 06 injetados somente com o meio de cultura das bactérias e 02 com solução de cloreto de sódio a 0,9%; os ratos do grupo C inoculados com o meio de cultura e estudados por microscopia óptica, foram sacrificados nos períodos de 02, 04 e 08 horas: 02 animais para cada período respectivamente e 02 animais, que receberam solução de cloreto de sódio a 0,9%, sacrificados após 08 horas e encaminhados um para estudo por microscopia óptica e outro para microscopia eletrônica.

3.2 PREPARO DO INÓCULO PARA INDUÇÃO DA PERITONITE COM QUANTITATIVOS E QUALITATIVOS BACTERIANOS CONHECIDOS

O autor utilizou 2 cepas: *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Bacteroides fragilis* ATCC 23745, cepas estas obtidas de amostras

lioofilizadas do *American Type Culture Collection*, Atlanta - USA. As amostras foram suspensas em água destilada estéril para reativação das cepas. As suspensões de *Escherichia coli* foram subcultivadas em placas de ágar-sangue e incubadas aerobicamente a 37° C por 18 horas. As suspensões de *Bacteroides fragilis* foram subcultivadas em placas de ágar-sangue suplementado para anaeróbios e incubadas anaerobicamente a 37° C por 48 horas.

Após a incubação, as cepas foram subcultivadas em caldo peptona extrato de levedura e incubadas novamente nas atmosferas indicadas por 18 horas. A concentração de 10^9 , foi obtida através de diluições seriadas do inóculo inicial em caldo peptona extrato de levedura. Esta suspensão foi preparada e utilizada no mesmo dia para cada grupo de animais e conservadas em geladeira (4° C) até a inoculação. As concentrações bacterianas eram medidas em meios apropriados para contagem de colônias (*Agar plate count*). Após foram preparadas as suspensões (fig.1), das quais utilizou-se 100 ml de solução de *Escherichia coli* e 100 ml da solução de *Bacteroides fragilis*.

As suspensões continham:

- A - Suspensão a 10^9 : composta de $2,8 \times 10^9$ UFC/ml de *Escherichia coli* +
- B - Suspensão a 10^9 : composta de $1,33 \times 10^9$ UFC/ml de *Bacteroides fragilis*

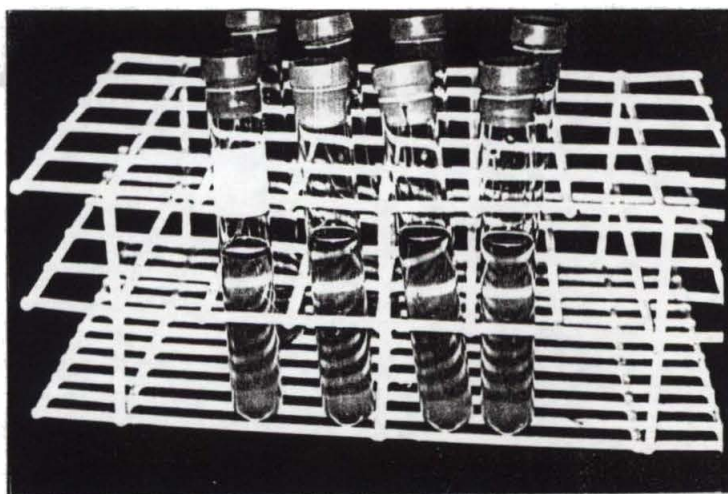


Fig.1 - Suspensões utilizadas para inoculação, contendo *Escherichia coli* e *Bacteroides fragilis*

3.3 TÉCNICA DE INOCULAÇÃO DA SUSPENSÃO BACTERIANA

Os ratos foram submetidos à anestesia inalatória com éter anestésico, e posterior anti-sepsia do quadrante abdominal caudal direito usando-se álcool a 70%. A inoculação foi realizada por punção per-cutânea intra-peritoneal (fig.2)

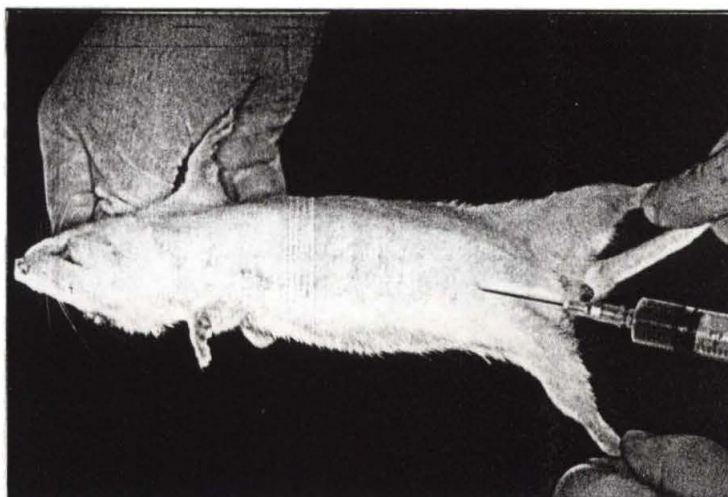


Fig.2 - Técnica de inoculação per-cutânea intra-peritoneal da suspensão

A quantidade injetada foi de 1 ml de inóculo bacteriano para cada 100 gramas de peso dos ratos.

3.4 OBSERVAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS

As alterações clínicas observadas e características do estado séptico evolutivo dos animais foram:

- redução da ingestão de água e ração;
- diminuição das atividades físicas;
- aumento dos movimentos respiratórios;
- piloereção;
- formação de um halo de coloração preta em torno dos olhos.

Durante todo o experimento, os animais receberam sempre ração *ad libitum* e água livre, assim como avaliações periódicas.

3.5 SACRIFÍCIO, PERFUSÃO E FIXAÇÃO DOS ANIMAIS

Em todo o experimento, o sacrifício dos animais foi realizado por perfusão intracardíaca, após anestesia com inalação de éter sulfúrico, e estabelecido em tempos diferentes e especificados abaixo:

GRUPO A - Microscopia óptica

Sacrifício de 3 animais em 2, 4, 8, 12 e 24 horas após a inoculação.

GRUPO B - Microscopia eletrônica

Sacrifício de 2 animais em 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas após inoculação. O estudo por microscopia eletrônica foi realizado apenas a nível de peritônio diafragmático.

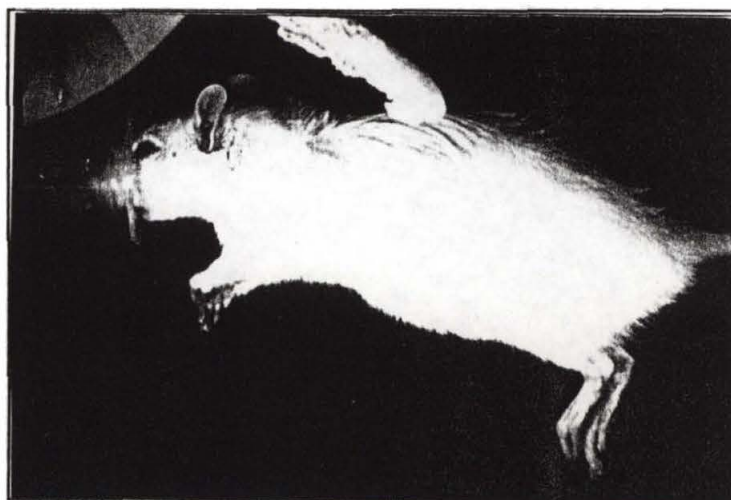


Fig. 3 - Anestesia do animal por inalação de éter sulfúrico.

TÉCNICA DE PERFUSÃO

Após anestesia, os animais eram colocados em posição supina, fixados com alfinetes em um suporte de cortiça plano (fig. 4).

Após laparotomia e toracotomia, o átrio direito era incisado com pequena tesoura para permitir o escape sanguíneo e o coração delicadamente segurado com pinça atraumática. Uma delicada agulha puncionava o ventrículo esquerdo, no qual era introduzido, por seringa plástica (fig.5), a solução fixadora, em volume total de perfusão de

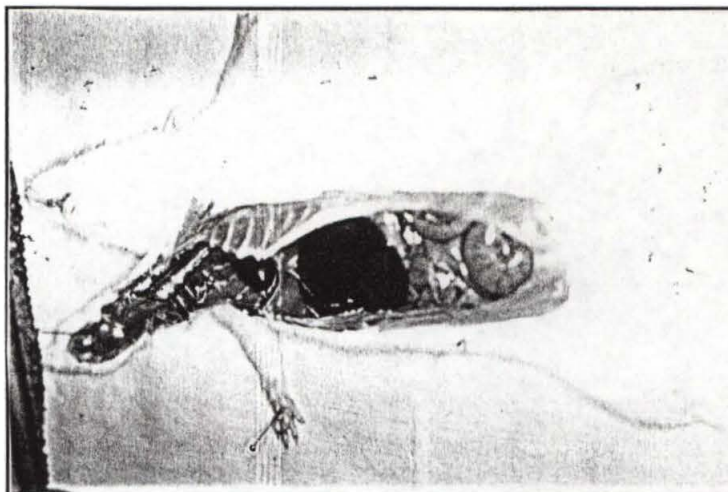


Fig. 4 - Animal em posição supina, fixado em suporte de cortiça, submetido à laparotomia e toracotomia.

aproximadamente 60 a 80 ml. Tal procedimento era executado em cerca de 30 a 45 segundos, visando obter fixação imediata das vísceras animais, com mínimo de alterações artefatuais induzidas pela hipóxia terminal. Todos os animais foram sacrificados com anestesia e com batimentos cardíacos evidenciáveis.

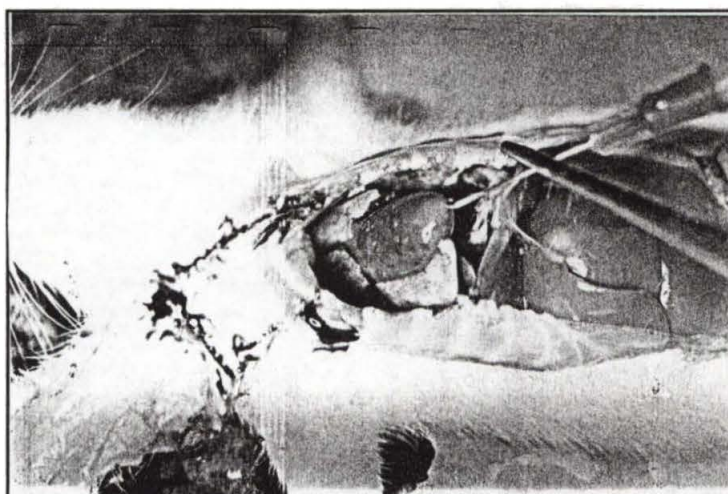


Fig. 5 - Punção cardíaca em ventrículo esquerdo com seringa contendo solução fixadora

A solução fixadora para o grupo A (estudado por microscopia óptica) foi Formol-cálcio constituído de :

Formaldeído 40% -	100 ml
Água destilada -	90 ml
Acetato de cálcio -	1 grama

A solução fixadora para o grupo B (microscopia eletrônica) foi a de KARNOVSKY (1965), constituída de:

Glutaraldeído 25% -	12 ml
Paraformaldeído 10% -	20 ml
Cacodilato de sódio 0,2 M -	40 ml
Água destilada -	28 ml
Cloreto de cálcio (Ca Cl ₂) -	50 mg

O sucesso da perfusão pôde ser avaliado pelo endurecimento do corpo e cauda do animal, e pela visualização do descoramento das vísceras.

Os animais do grupo B, após fixação, foram deixados em solução de KARNOVSKI, e os do grupo A, em formol, até o momento da necrópsia, 24 horas após.

A seguir realizou-se necrópsia, com dissecação cuidadosa e completa de todas as vísceras torácicas e abdominais, sendo as peças acondicionadas em frascos numerados, para posterior estudo microscópico.

3.6 TÉCNICAS HISTOLÓGICAS

Após as peças fixadas, conforme os seus respectivos grupos, utilizou-se a seguinte rotina de processamento:

A - MICROSCOPIA ÓPTICA

O pós-fixador utilizado foi Formol Acético Metanol (FAM) preparado segundo o método de DAVID (1960).

Formaldeído 40%	10 ml.
Ácido acético glacial	10 ml.
Metanol absoluto	80 ml.

Após a retirada das peças (perfundidos por formol - cálcio) foram colocados no pós-fixador por 24 horas. A rápida penetração e desidratação pelo FAM diminui artefatos de retração tecidual durante o processamento técnico.

Após fixação e pós-fixação o material foi desidratado em séries crescentes de Álcool Etílico.

Álcool etílico 70% - 2 horas
Álcool etílico 80% - 2 horas
Álcool etílico 90% - 2 horas
Álcool etílico 100% - 1 hora
Álcool etílico 100% - 1 hora
Álcool etílico 100% - 1 hora
Álcool etílico 100% - 1 hora

A diafanização (substituição do álcool pelo xilol devido ao álcool não ser miscível com a parafina) foi realizada com xilol.

Xilol I - 1 hora
Xilol II - 1 hora
Xilol III - 1 hora

Após os banhos de xilol a peça se torna translúcida. Em seguida, foi realizada a impregnação e inclusão com parafina, para que o tecido mantivesse a estrutura original.

Parafina - 2 horas
Parafina - 2 horas

O material, antes de ser processado, foi cortado transversalmente conforme técnica de cortes seriados de BEESLEY e DANIEL (1956), em fatias de 2 mm, seguindo sempre um padrão anatômico e incluído na parafina seqüencialmente em um único bloco.

Os cortes foram feitos em micrótomo do tipo *American Optical Corporation*, com espessura de 5 micrômetros, perfazendo aproximadamente 200 lâminas histológicas.

A coloração de rotina utilizada foi a Hematoxilina - Eosina (HE). Ressalte-se que colorações especiais, incluindo gram, reticulina e tricrômico de Gomori, foram também realizadas.

TÉCNICA PARA COLORAÇÃO

Identificaram-se as lâminas adequadamente com caneta de diamante para não se perder a numeração entre os solventes e após fez-se o processamento, banhando-as na seguinte seqüência:

Xilol I	-	5 minutos	
Xilol II	-	5 minutos	
Álcool 100%	-	3 minutos	
Álcool 90%	-	3 minutos	
Álcool 70%	-	3 minutos	
Lavagem com água destilada - 5 minutos			
Corante Hematoxilina - 1 ½ minutos			
Lavagem com água destilada - 5 minutos			
Corante Eosina - ½ minuto			
Lavagem com água destilada - 5 minutos			
Desidratação: Álcool 95% - 1 minuto			
Álcool 100% - 3 minutos			
Álcool 100% - 3 minutos			
Diafanização: com 03 banhos de xilol - 5 minutos			

Finalmente, após estes passos metodológicos, realizou-se a montagem das lâminas em bálsamo do Canadá para posterior estudo histológico.

B - MICROSCOPIA ELETRÔNICA

O preprocessamento para a microscopia eletrônica realizou-se da seguinte forma:

- Lavagem com Tampão Cacodilato 0,1 M
- Pós-fixação em Tetróxido de Ósmio a 1% (p/ contrastar a membrana plasmática)
- Lavagem com água destilada e posteriormente
- Desidratação em séries de álcoois - 70%, 90%, 100%, 100%, 100% - 10 minutos cada um.

Após esta desidratação, utilizou-se o óxido de propileno na seqüência abaixo referida, com o objetivo de incorporar a resina ao material experimental.

- Óxido de propileno - 2 vezes de 15 min
- Óxido de proxileno + Resina 3:1 - 1 hora
- Óxido de proxileno + Resina 1:1 - 1 hora

Óxido de proxileno + Resina 3:1 - 24 horas
Óxido de proxileno + Resina 1:1 - 24 horas
Resina pura 24 horas (em frasco aberto)
Inclusão em resina pura (resina tipo Araldite).

Após todo processamento realizou-se cortes deste material em ultra-micrótomo Super Nova Reichert com 600 Å de espessura sendo estes cortes corados

em citrato de chumbo - 1 minuto
e após em Uranila a 2% - 30 minutos.

Finalizando observou-se os cortes colocados em telas apropriadas no Microscópio Eletrônico EM-300.

3.7 DOCUMENTAÇÃO FOTOGRÁFICA

Em relação à documentação fotográfica, as fotomicrografias foram batidas em microscópio *American-Optical-Spencer*, com câmara Pentax-Mx acoplada, através de tubo adaptador, com filme Kodak Gold (100 ASA).

3.8 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Utilizou-se a metodologia estatística nos dados numéricos resultantes do trabalho, ou seja, na avaliação da variação ponderal dos animais.

Na análise dos dados dos grupos que constituem este estudo, o procedimento estatístico foi o da aplicação do método inferencial - teste *t-Student*, para comparação entre os mesmos pareados, peso de inoculação (π_i) e peso de sacrifício (π_s) dos grupos A e B.

Para aplicação desta técnica verificou-se a premissa de Gaussianidade para as amostras das diferenças entre π_i e π_s , utilizando-se o teste de FILLIBEM (1975).

Para os π_i e π_s de cada grupo, com os correspondentes π_i e π_s do grupo controle, aplicou-se também uma Análise da Variância, na

MATERIAL E MÉTODOS

variável resposta nos níveis pi e ps respectivamente. Aqui, as premissas de Gaussianidade, homogeneidade da variância e independência dos resíduos, foram todas verificadas.

Utilizou-se para este trabalho a nomenclatura anatômica veterinária de 1983. Aplicaram-se as normas para referências bibliográficas e abreviaturas de títulos e periódicos da Associação Brasileira de Normas Técnicas (NBR- 6023) de 1989 e as normas para apresentação de trabalhos da Universidade Federal do Paraná (1992).



4.0 RESULTADOS

4.0 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA PÓS INDUÇÃO DE PERITONITE

No período pós indução de peritonite os ratos foram observados através de avaliação clínica subjetiva referente aos seguintes dados:

- diminuição da atividade física dos animais
- redução na ingestão de água
- diminuição na ingestão de ração
- aumento dos movimentos respiratórios
- formação de halo de coloração preta ao redor dos olhos (fig.6)
- piloereção (fig.7)

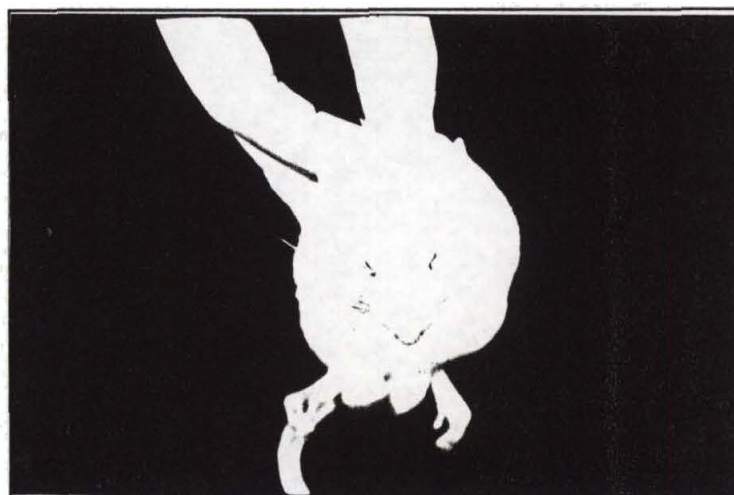


Fig. 6 - Observação clínica do animal com halo preto ao redor dos olhos.

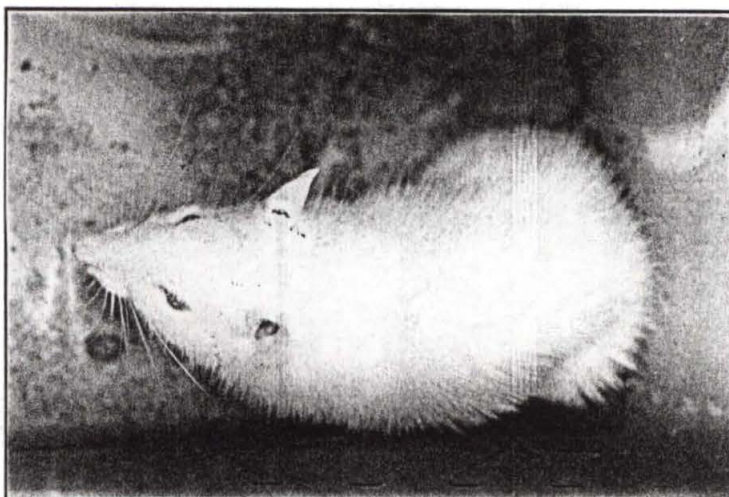


Fig. 7 - Observação clínica do animal com piloereção.

Quanto aos animais do grupo controle tanto nos inoculados com solução de cloreto de sódio a 0,9 % como nos com meio de cultura, não se observou as alterações clínicas anteriormente relacionadas.

Todos os animais, inoculados com a suspensão bacteriana de ambos os grupos, apresentaram estas alterações de forma variada, duas a três horas após indução de peritonite.

4.2 VARIAÇÃO PONDERAL

Conforme delineado nas tabelas 1, 2 e 3 dos grupos A, B e C respectivamente, em dois animais não foi observado o peso final, em função dos óbitos ocorrerem antes do período determinado para o sacrifício.

Pôde-se observar também que, nos grupos A e B, somente um animal de cada grupo apresentou um pequeno ganho de peso ao contrário dos animais do grupo controle onde sete, dos oito ratos, tiveram ganho de peso; sendo que o único animal deste grupo que perdeu peso, teve uma perda de 1 grama.

TABELA 1
Variação ponderal dos animais do GRUPO A

Microscopia Óptica		
Animal	Peso i	Peso s
1	182	180
2	125	122
3	187	180
4	138	135
5	139	138
6	179	180
7	149	147
8	169	168
9	152	152
10	164	163
11	191	189
12	200	195
13	144	140
14	160	155
15	182	-

TABELA 2
Variação ponderal dos animais do GRUPO B

Microscopia Eletrônica		
Animal	Peso i	Peso s
1	179	178
2	158	156
3	160	161
4	151	150
5	177	175
6	152	150
7	154	154
8	147	144
9	160	156
10	224	220
11	170	167
12	159	154
13	175	170
14	163	159
15	166	-

TABELA 3
Variação ponderal dos animais do GRUPO C

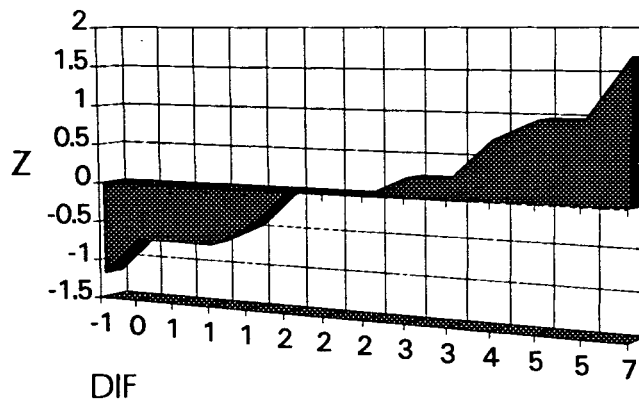
Animal	Peso i	Peso s
1	142	143
2	154	155
3	162	161
4	146	151
5	185	187
6	202	203
7	177	179
8	153	154

Peso i = peso de inoculação
Peso s = peso de sacrifício

Na análise estatística utilizada, conforme metodologia descrita no capítulo anterior, verificou-se a premissa de Gaussianidade aceita, conforme demonstrado nos gráficos 1 e 2, dos grupos A e B.

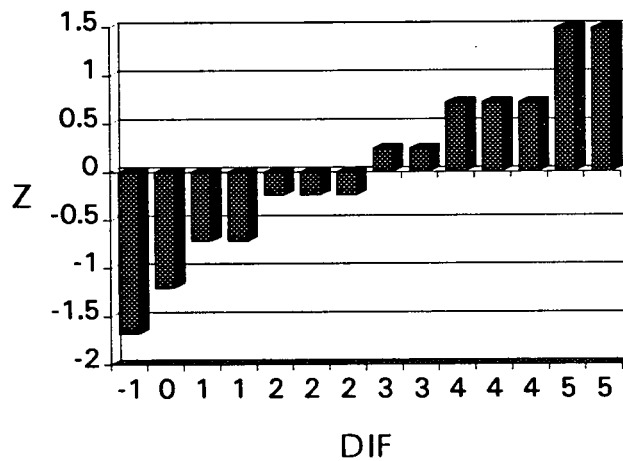
Vale ressaltar que o valor de tabela (para uma amostra de n=14) aceito para a correlação da diferença dos pesos (DIF) e escore padronizado das diferenças (Z) devem ser encontrados no intervalo igual ou superior a 0,930.

GRÁFICO 1
 Premissa de Gaussianidade para o
 GRUPO A



Correlação entre DIF e Z = 0,991

GRÁFICO 2
 Premissa de Gaussianidade para o
 GRUPO B



Correlação entre DIF e Z = 0,996

Z = escore padronizado das diferenças
 DIF = diferença dos pesos

Os testes *t* aplicados forneceram valores *p*, respectivamente de 0,0009 para o grupo A e 0,0001 para o grupo B, indicando que os π_i são estatisticamente distintos dos π_s , nos grupos pareados.

Já em relação ao π_i e π_s de cada grupo (A e B), com seus correspondentes do grupo C, não se verificou diferença estatisticamente significativa; os valores *p* em cada teste (π_i e π_s) foram 0,889 e 0,753.

4.3 ALTERAÇÕES ANATOMO-PATOLÓGICAS VISCERAIS DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE

Após necrópsia meticulosa amostras foram estudadas do coração, pulmões, peritônio diafragmático, esôfago, estômago, intestino delgado, intestino grosso, útero, ovários, linfonodo, baço, fígado, bexiga urinária e rins.

As alterações encontradas foram:

4.3.1 FÍGADO

Alteração de coloração condizente com dificuldades em perfusão tecidual, porém sem repercussão da preservação histológica em todos os animais. Evidenciou-se, à microscopia óptica, discreta portite crônica (n=2) bem como discreto infiltrado neutrofílico centro-lobular e sinusoidal (n=1), provavelmente decorrentes de perfusão inadequada.

4.3.2 PULMÃO

Foi encontrada, em todos os animais, discreta hemorragia intra-alveolar antiga.

4.3.3 CORAÇÃO

Encontrou-se áreas de solução de continuidade e pinçamento decorrentes da técnica de perfusão em todos os animais.

Nas demais vísceras não foram encontradas alterações anatomo-patológicas.

4.4 ALTERAÇÕES ANATOMO-PATOLÓGICAS VISCERAIS DOS ANIMAIS COM PERITONITE

As observações deste experimento foram feitas principalmente por microscopia óptica (grupo A) sendo que, no peritônio diafragmático após o mapeamento à microscopia óptica, realizaram-se observações com microscopia eletrônica (grupo B) para melhor caracterização do processo.

4.4.1 PERITÔNIO DIAFRAGMÁTICO

Como se pode observar na tabela 4, os animais inoculados com a suspensão bacteriana apresentaram na face peritoneal diafragmática, desde alterações discretas (como hiperplasia mesotelial), até alterações mais evidentes (como focos de exsudação neutrofílica) com deposição de fibrina. Tais alterações predominaram ao redor de 4 a 8 horas após indução de peritonite e apresentaram graus variados nos diversos animais estudados.

TABELA 4
Alterações histopatológicas de
peritônio diafragmático

	H.M.	E.N.	Fibrina
A1-2N	++/D	-	-
A2-2H	+/D	++/D	-
A3-2H	-	-	-
A1-4H	+/D	++/F	-
A2-4H	+++/D	++/D	-
A3-4H	++/D	+/D	-
A1-8H	-	-	-
A2-8H	+++/D	++/D	+/D
A3-8H	++/D	-	-
A1-12H	+/D	+/D	-
A2-12H	++/D	++/D	-
A3-12H	+/D	-	-
A1-24H	+++/D	+++/D	-
A2-24H	++/D	+/D	-

H.M. = Hiperplasia mesotelial

E.N. = exsudato neutrofílico

D = difuso (mais de 2 focos)

F = focal (até 2 focos)

+++ = acentuado

++ = moderado

+ = discreto

As figuras, a seguir relacionadas, demonstram as diversas alterações microscópicas a nível de peritônio diafragmático. Estão elas correlacionadas com o horário transcorrido após a inoculação da suspensão bacteriana, conforme descrição nas respectivas legendas.

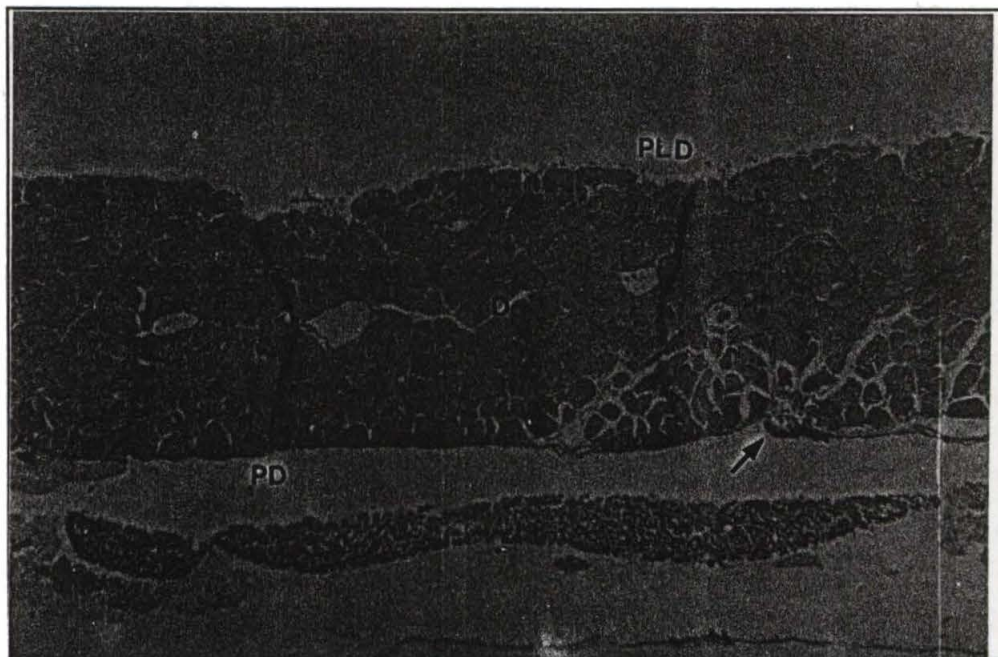


Fig 8 - Corte histológico de diafragma (D), após 04 horas demonstrando extensa reação inflamatória em peritônio diafragmático (PD), com área focal de extensão intra-diafragmática (→), pleura diafragmática (PLD) sem alterações.
HE X 100

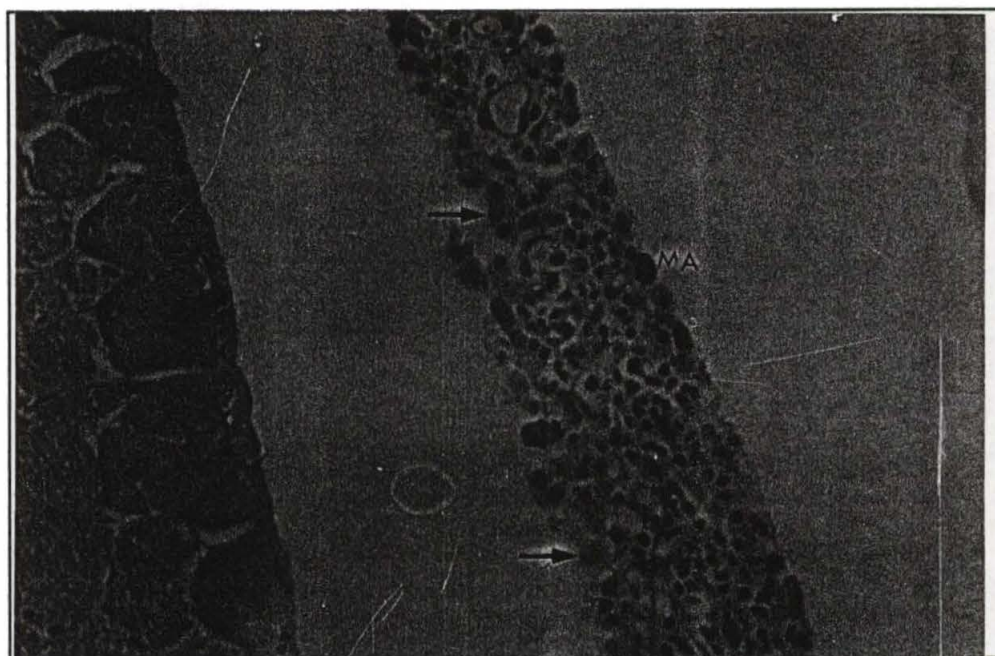


Fig 9 - Demonstração de exsudato neutrofilico e infiltrado monocitário, envolvendo células mesoteliais hiperplasiadas (→).
MA - Macrófagos
HE X 400

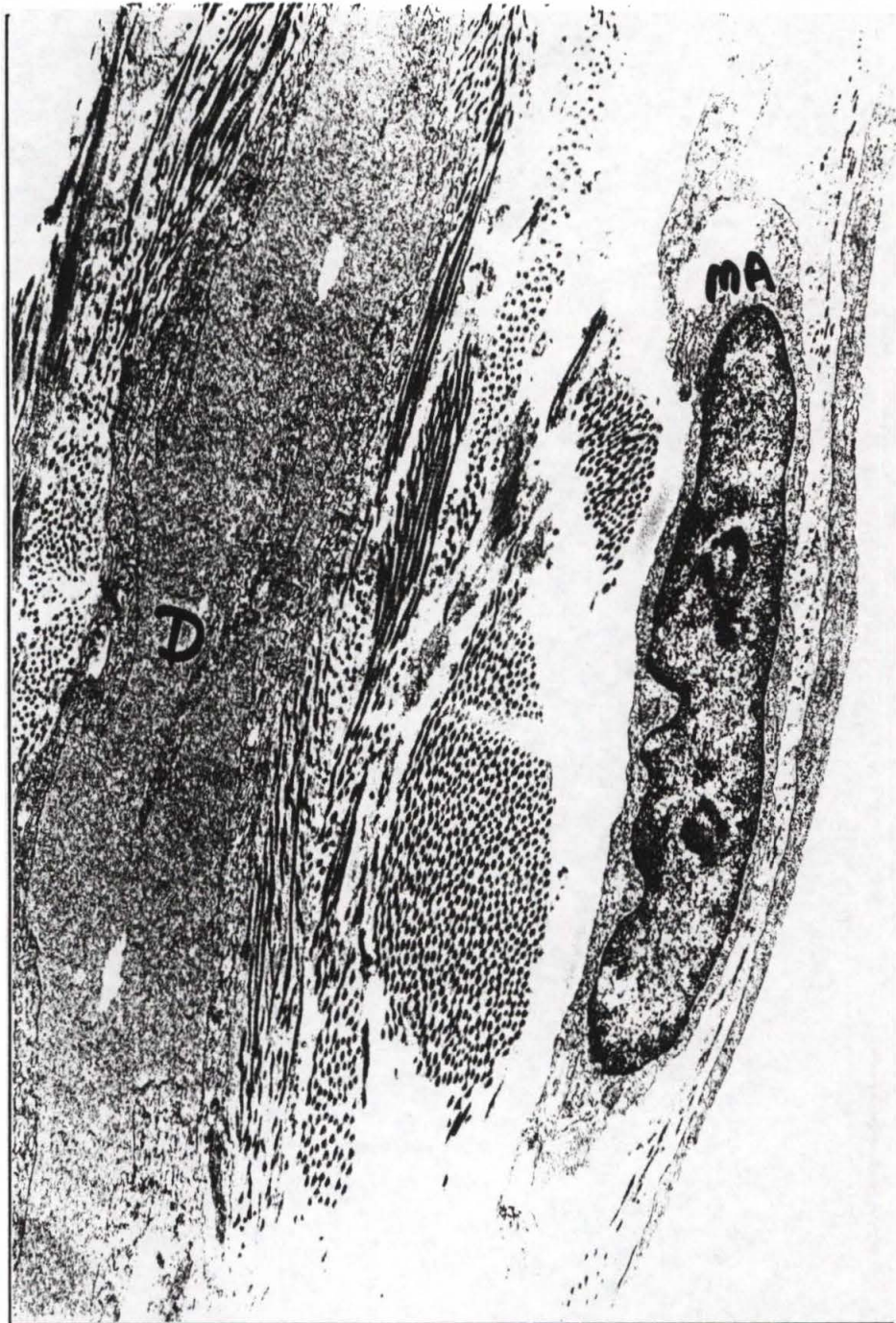


Fig. 10 - Corte ultraestrutural de peritônio diafragmático (D), após 02 horas, com macrófagos (MA), demonstrando início da resposta inflamatória.

ACETATO DE CHUMBO / URANILA X 15.700

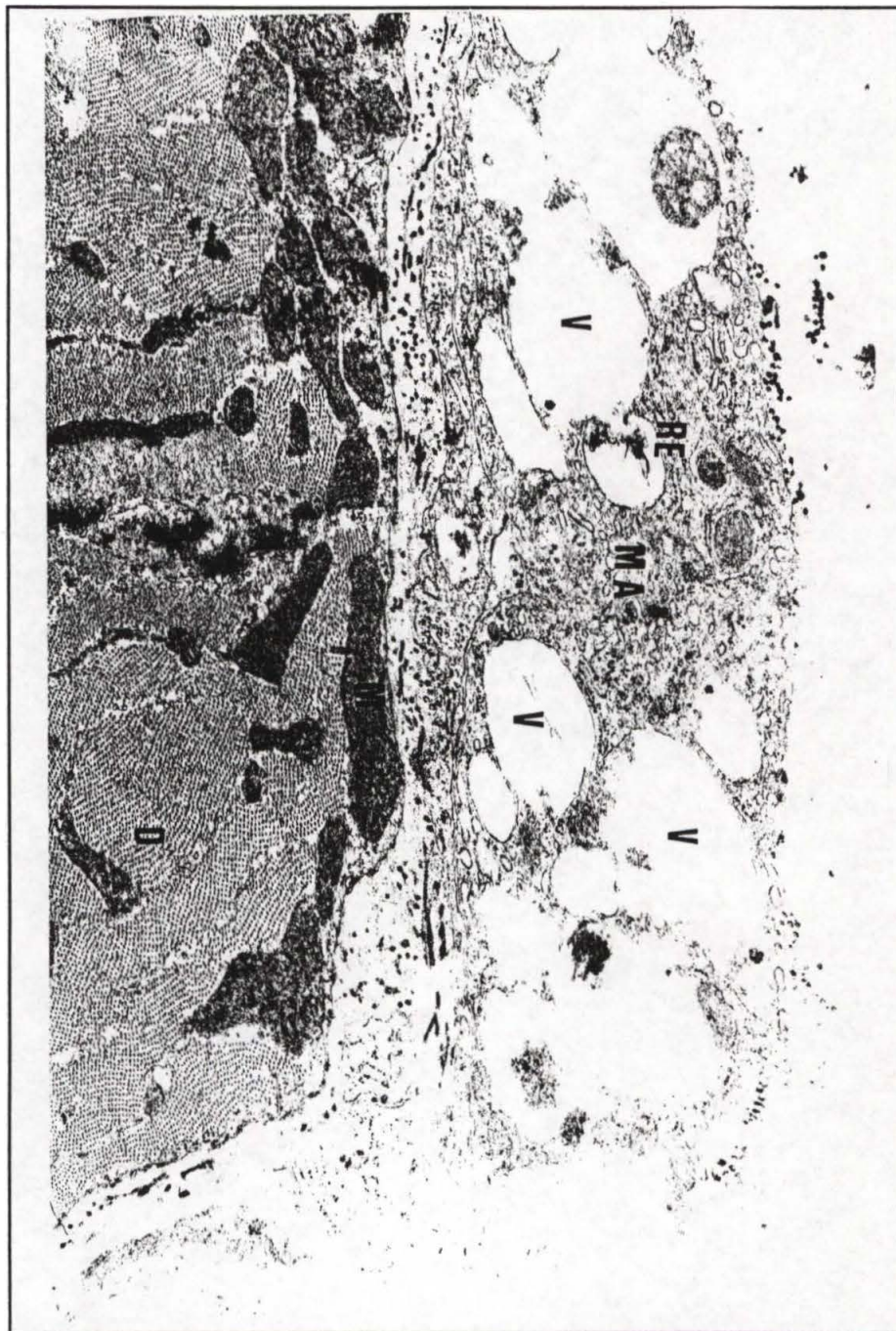


Fig. 11 - Corte ultraestrutural de peritônio diafragmático após 12 horas, demonstrando macrófagos (MA), com vacúolos fagocíticos (V), contendo bactérias. Mitocôndria e retículo endoplasmático rugoso (RE) preservado.

A figura apresenta ainda fibras musculares diafragmáticas (D) e mitocôndrias subsarcolemais (M).

ACETATO DE CHUMBO / URANILA X 18.600



Fig. 12 - Corte ultraestrutural de peritônio diafragmático, após 12 horas, demonstrando célula mesotelial hiperplásica (ME), além de fibras musculares diafragmáticas (D).

ACETATO DE CHUMBO / URANILA X 18.600

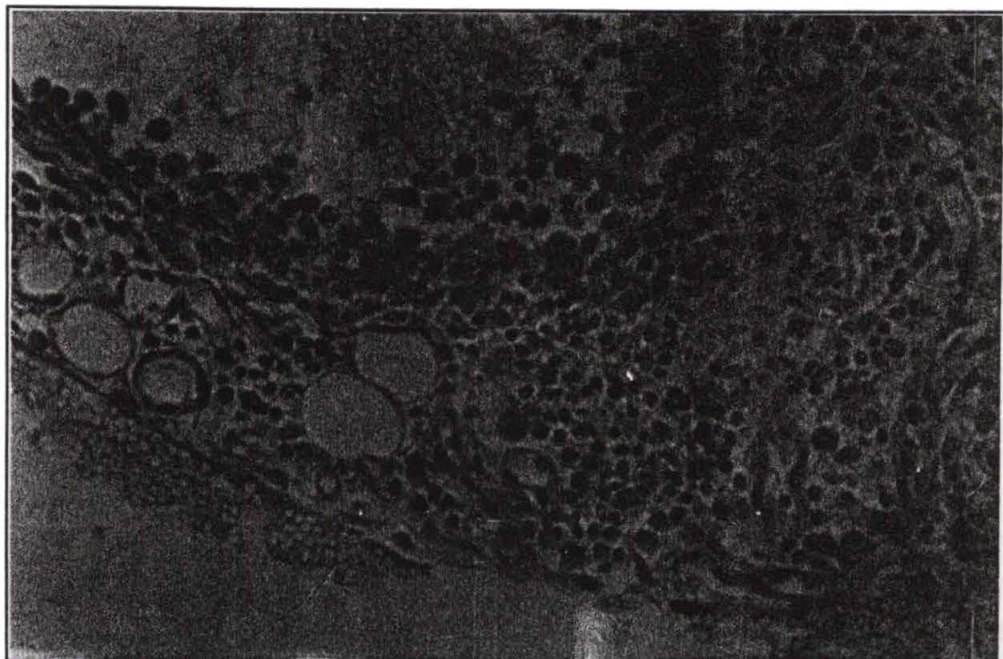


Fig 13 A - Corte histológico de peritônio diafragmático, após 24 horas, demonstrando extensa reação inflamatória e mesotélio hiperplasiado. HE X 400

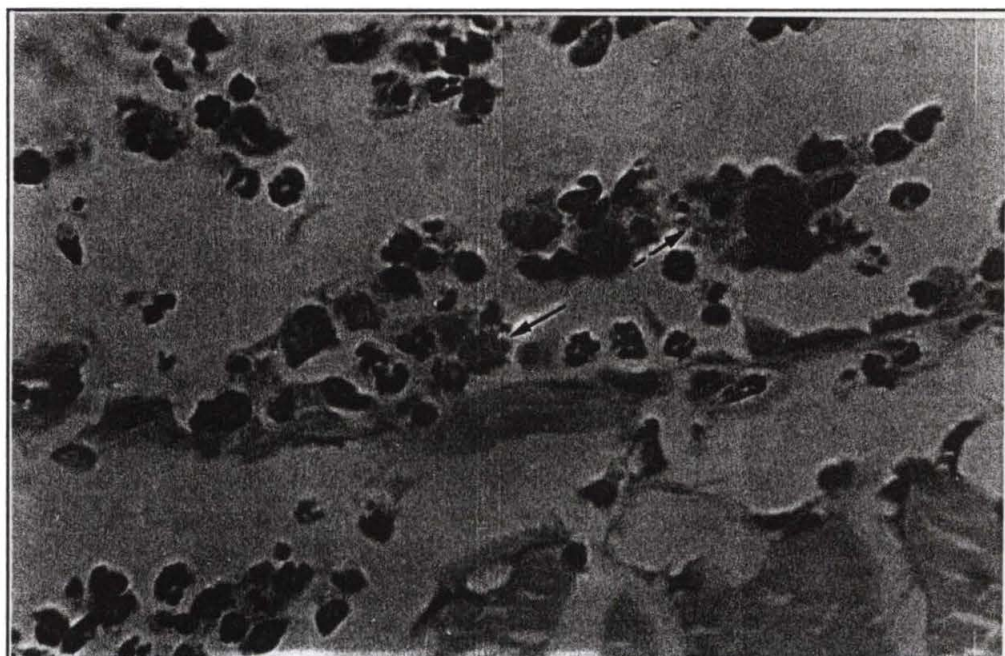


Fig. 13 B - Corte histológico de peritônio diafragmático, após 24 horas, com coloração de Gram, demonstrando, em meio a inúmeros neutrófilos, agregados de bactérias gram negativas (→). X 1.000

4.4.2 FÍGADO

Os animais estudados apresentaram alterações tanto no parênquima como na cápsula hepática, as quais estão resumidas na tabela 5. Os focos de abscessos intra-hepáticos predominaram, após 08 horas, atingindo o máximo nos animais 12 e 24 horas pós-peritonite.

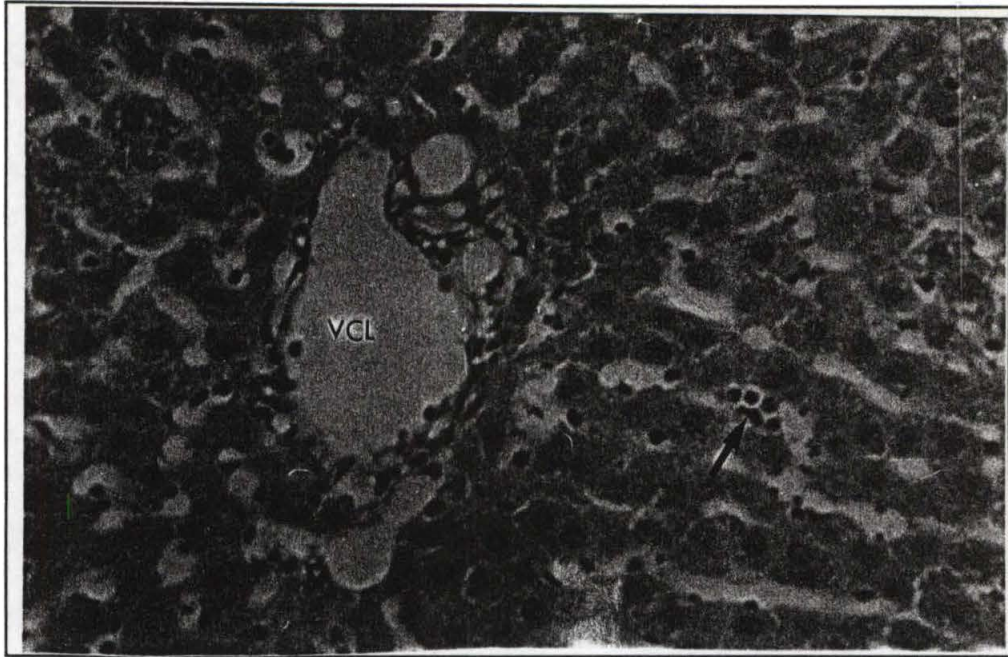
TABELA 5
Alterações histopatológicas do fígado

	EN SS	EN PP	EN CL	MA	MMN PP	EC CP
A1-2H	+/D	-	-	-	-	-
A2-2H	+/D	+/D	-	-	+/D	-
A3-2H	-	-	-	-	-	-
A1-4H	+/D	-	-	+/F	-	+/F
A2-4H	+/D	+/D	-	+/F	+/D	-
A3-4H	+/D	+/F	-	-	-	-
A1-8H	++/D	-	-	+/D	-	-
A2-8H	-	-	-	-	-	-
A3-8H	-	-	-	-	-	+++/D
A1-12H	+++/D	-	-	+/D	-	-
A2-12H	+++/D	-	-	+/D	-	-
A3-12H	-	+/D	-	-	+/D	-
A1-24H	+/D	-	-	-	-	-
A2-24H	+++/D	-	++/D	+++/D	-	++/D

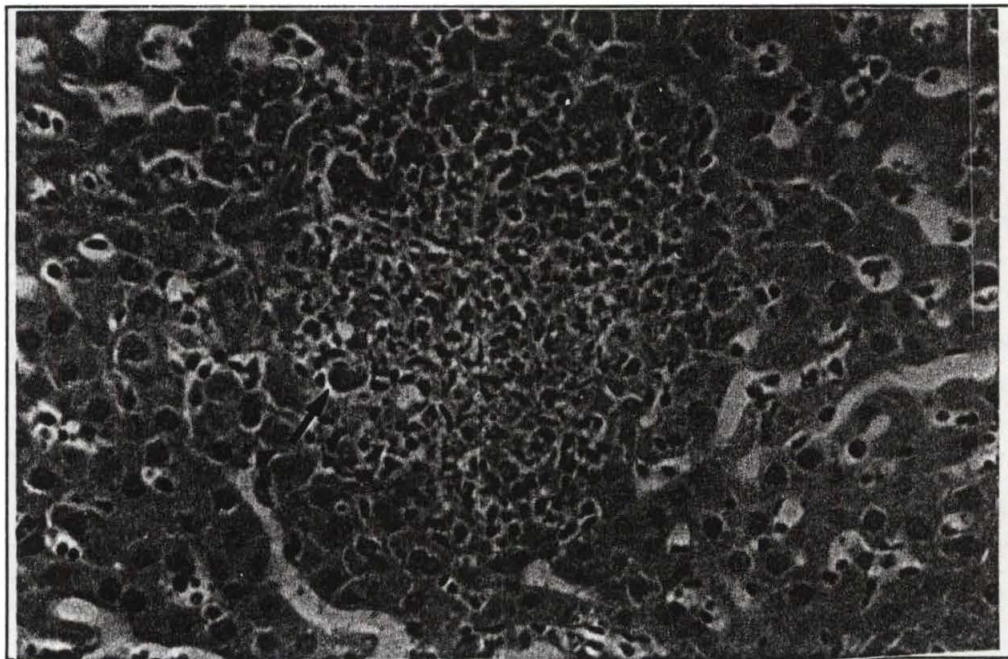
E.N. = exsudato neutrofilico
MMN = monomorfonucleares
PP = peri-portal
CP = cápsula

MA = microabscessos
SS = sinusoides
CL = centro-lobular

As figuras a seguir relacionadas, demonstram as diversas alterações microscópicas, a nível de fígado, correlacionando-as com o horário transcorrido pós inoculação da suspensão bacteriana, conforme descritos nas respectivas legendas.



*Fig. 14 - Corte histológico de fígado, após 02 horas, demonstrando veia centrolobular (VCL), com cordões hepatocíticos preservados e mínimo exsudato neutrofilico sinusoidal (→).
HE X 400*



*Fig. 15 - Corte histológico de fígado, após 08 horas, demonstrando microabscessos, com ocasionais hepatócitos necróticos (→).
HE X 400*

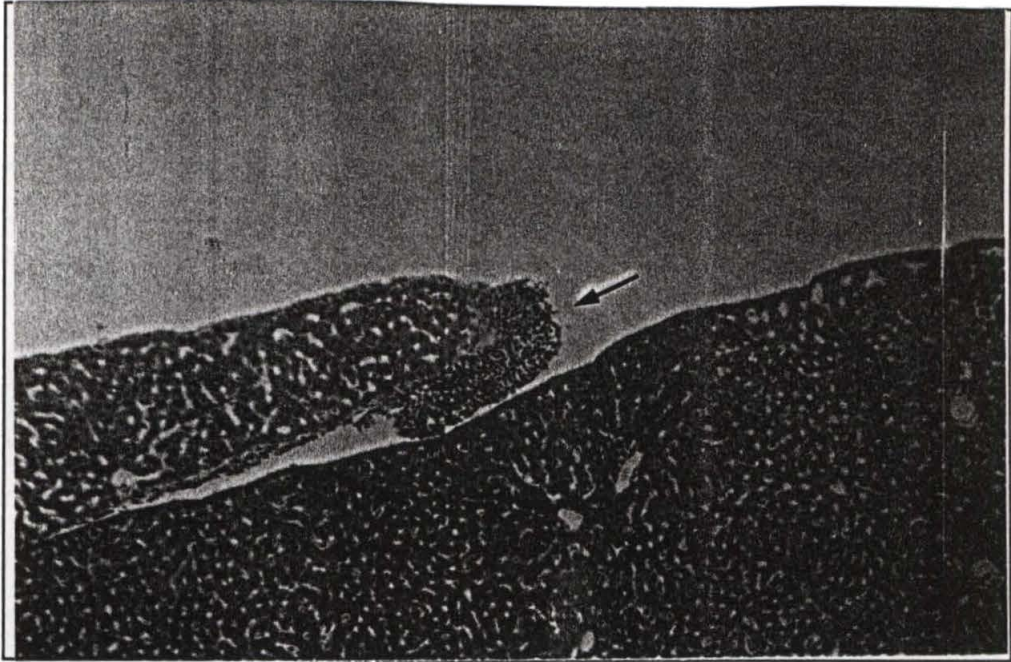


Fig. 16 - Corte histológico de peritônio visceral hepático, após 08 horas, demonstrando peritonite capsular hepática focal (→).
HE X 400

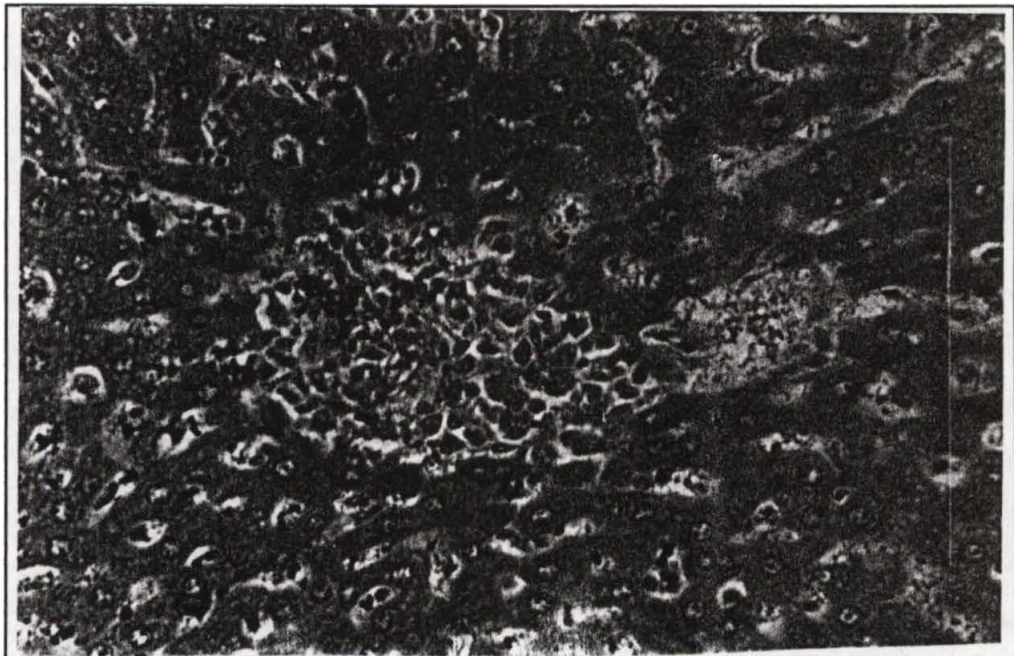


Fig. 17 - Corte histológico de fígado, após 24 horas, demonstrando microabscessos, provocando destruição de cordões hepatocíticos e colapso da estrutura hepática com discreta fibrose reacional.
TRICROMICO DE GOMORI X 400

4.4.3 BAÇO

Não houve lesão em parênquima esplênico em nenhum animal. Um dos animais sacrificados com 2 horas apresentava exsudação neutrofílica no tecido adiposo do hilo. Todos os animais sacrificados com 4 horas, e dois com 8, 12 e 24 horas, também apresentavam exsudação neutrofílica no hilo.

Um animal sacrificado com 4 horas apresentava exsudação neutrofílica e hiperplasia mesotelial discreta em cápsula esplênica.

Dos animais sacrificados com 8 horas, dois deles apresentavam exsudação neutrofílica em cápsula, sendo que um de intensidade moderada e o outro de grande intensidade acompanhada de hiperplasia mesotelial moderada.

Dos animais sacrificados com 12 horas um apresentava exsudação neutrofílica moderada em cápsula e um outro intensa exsudação com formação de abscesso e áreas de necrose, além de hiperplasia mesotelial intensa.

4.4.4 PULMÕES

As alterações observadas nos pulmões variaram de um exsudato neutrofílico em capilares de septos pulmonares a focos difusos de broncopneumonia com intensa exsudação neutrofílica intra-alveolar, deposição de fibrina e descamação epitelial, de acordo com a hora e o animal sacrificado, conforme mostra a tabela 6.

Observa-se na tabela 6 que os animais que apresentaram as alterações mais acentuadas foram os sacrificados com 4, 8 e 12 horas, com destaque para o segundo animal sacrificado com 4 horas (A2-4H) o qual apresentou focos bem evidentes de pneumonia com exsudação neutrofílica intra-alveolar, deposição de fibrina e descamação epitelial. Os animais sacrificados com 2 e 24 horas apresentaram alterações discretas, em relação aos controles.

As figuras, a seguir relacionadas, demonstram as diversas alterações microscópicas, a nível de pulmões, correlacionadas com o horário transcorrido na inoculação da suspensão bacteriana, conforme descrição nas respectivas legendas:

TABELA 6
Alterações histopatológicas dos pulmões

	EN Capilares	EN Septais Intersticial	EN-IA	Fibrina Descamação IA
A1-2H	+/D	-	-	-
A2-2H	+/D	-	-	-
A3-2H	+/D	-	-	-
A1-4H	+/D	+/D	-	-
A2-4H	++/D	++/D	+++/F	+++/F
A3-4H	++/D	++/D	++/F	-
A1-8H	+/D	+/D	+/D	-
A2-8H	+++/D	+++/D	+++/D	-
A3-8H	+/D	+/D	-	-
A1-12H	+++/D	++/D	++/D	-
A2-12H	+/D	+/D	-	-
A3-12H	+/D	+/D	-	-
A1-24H	+/D	-	+/F	-
A2-24H	+/D	+/D	-	-

E.N. = exsudato neutrofilico *IA* = intra-alveolar
D = difuso (mais de 2 focos) *F* = focal (até 2 focos)
 +++ = acentuado ++ = moderado + = discreto

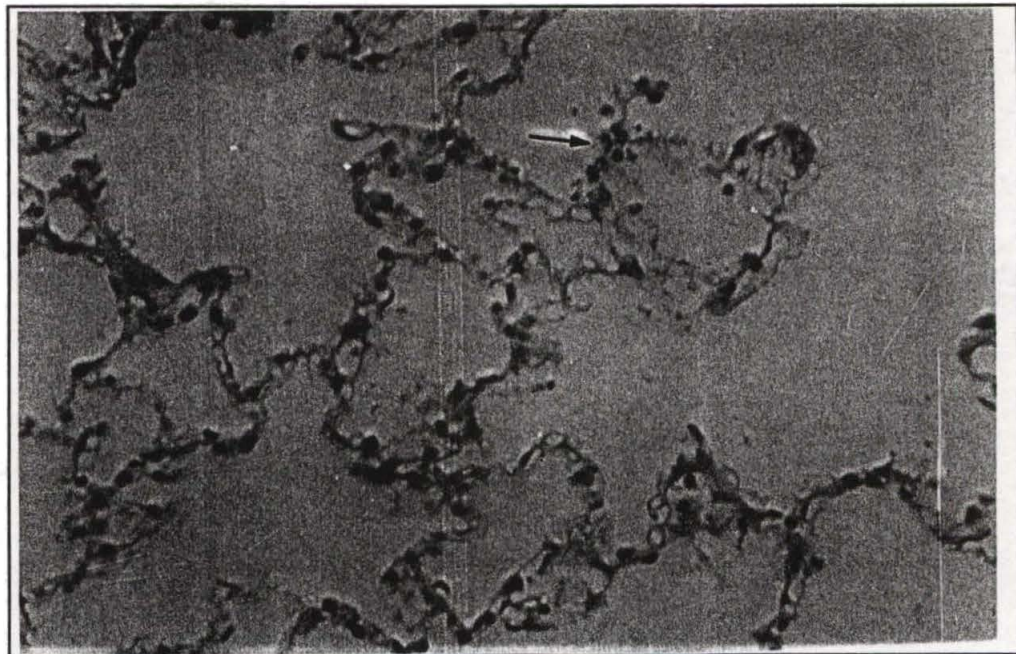


Fig. 18 - Corte histológico de pulmão, após 02 horas, demonstrando septos, alveolares com mínima exsudação neutrofilica (→).
HE X 400

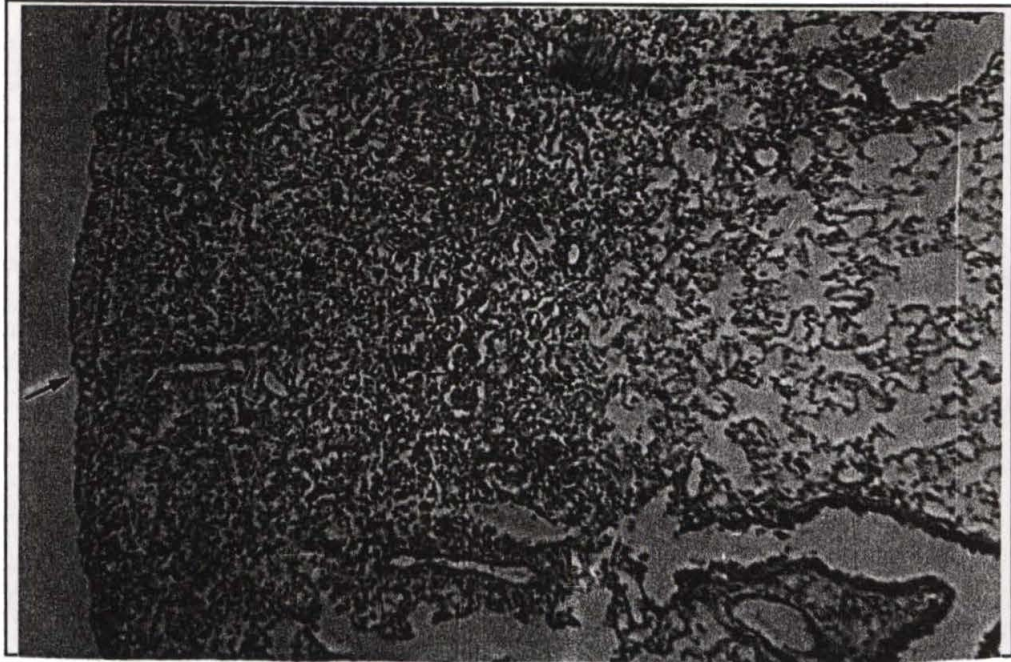
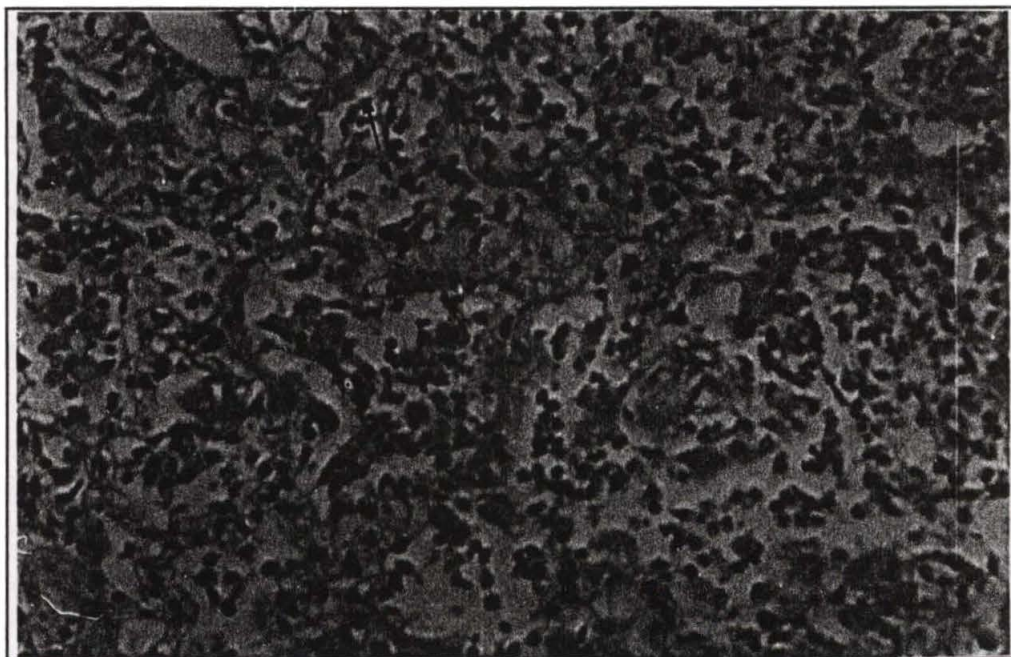


Fig. 19 A - Corte histológico de pulmão, após 04 horas, demonstrando extenso foco bronco-pneumônico (), com envolvimento da superfície pleural (->).
HE X 100*



*Fig. 19 B - Corte histológico de pulmão após 04 horas, onde se observa detalhe do exsudato neutrofílico intenso, com restos celulares de fibrina (-> de permeio.
HE X 400*

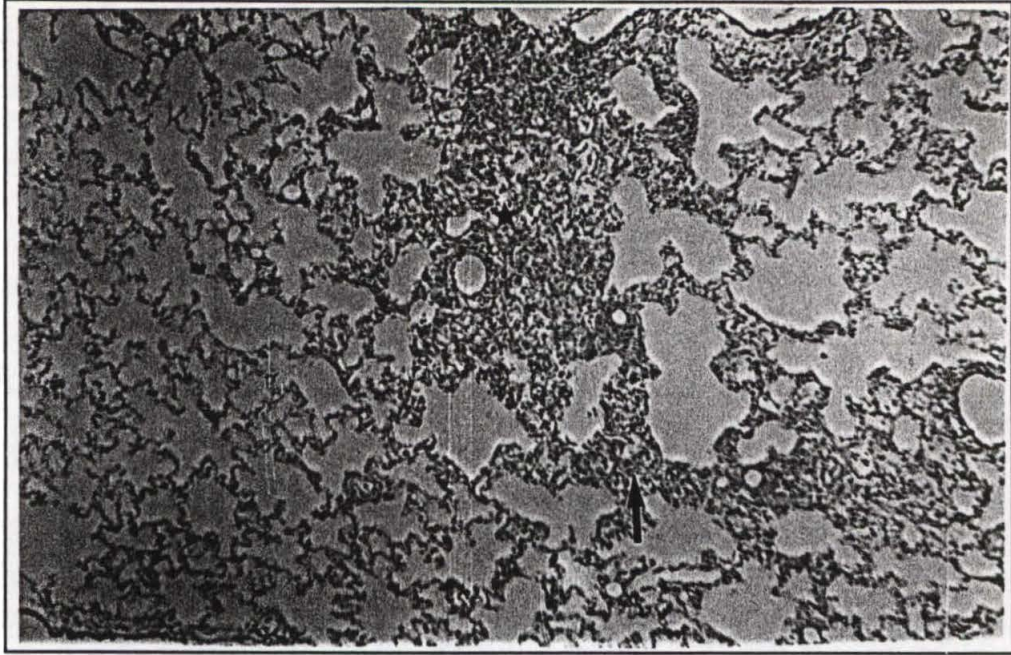


Fig. 20 A - Corte histológico de pulmão, após 08 horas, demonstrando foco bronco-pneumônico (*), com moderado espessamento de septos alveolares (→), às custas de neutrófilos e monócitos.
HE X 100

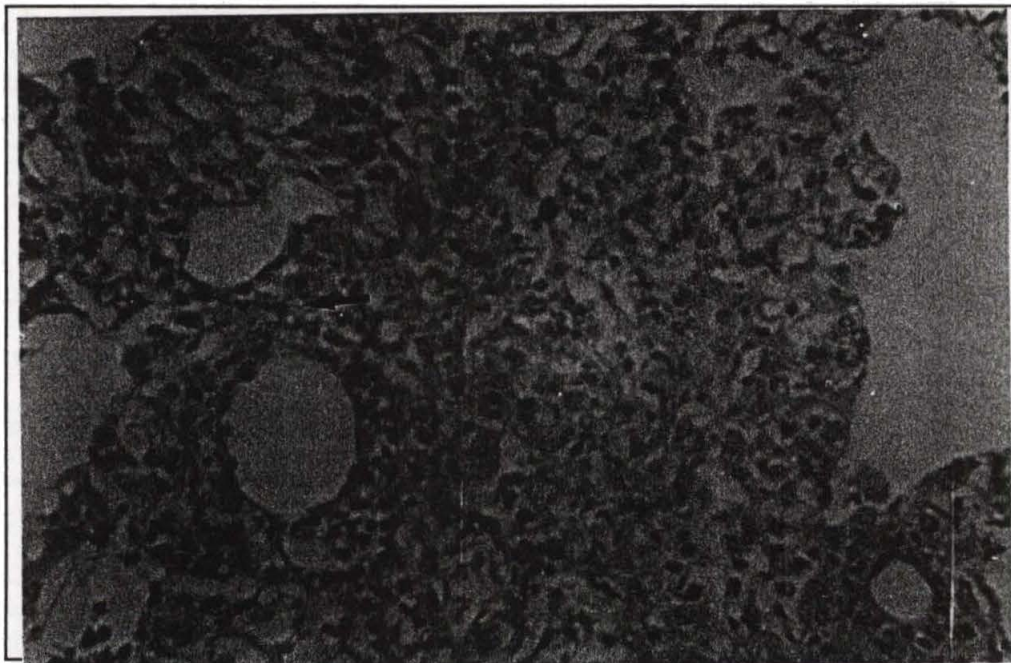


Fig. 20 B - Corte histológico de pulmão, após 08 horas, demonstrando-se espessamento de septos alveolares por células inflamatórias (→).
HE X 400

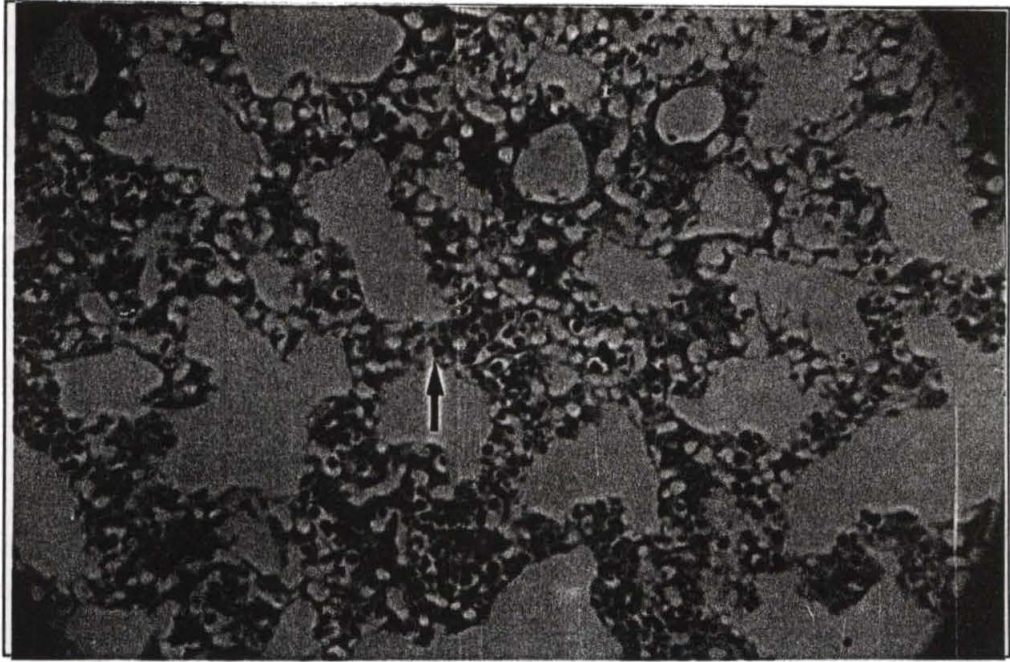


Fig. 21 - Corte histológico de pulmão, após 12 horas, demonstrando pneumonia intersticial (→).
HE X 400

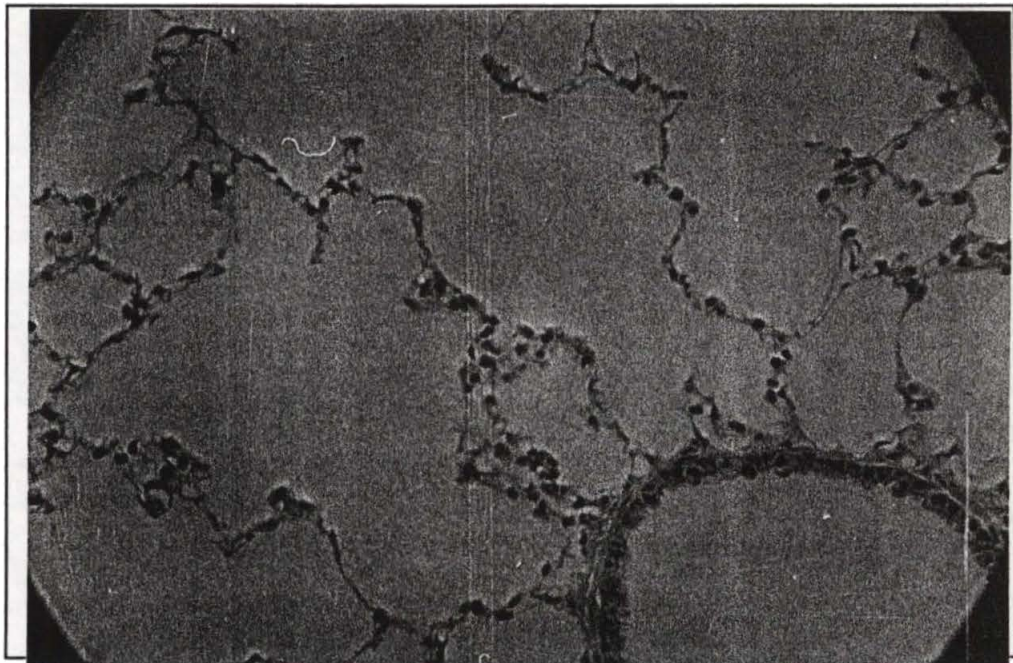


Fig. 22 - Corte histológico de pulmão, após 24 horas, demonstrando estrutura preservada com pequena resposta inflamatória.
HE X 400

4.4.5 CORAÇÃO

Não foram observadas alterações histopatológicas significativas no coração em microscopia óptica convencional em todos os animais estudados.

49

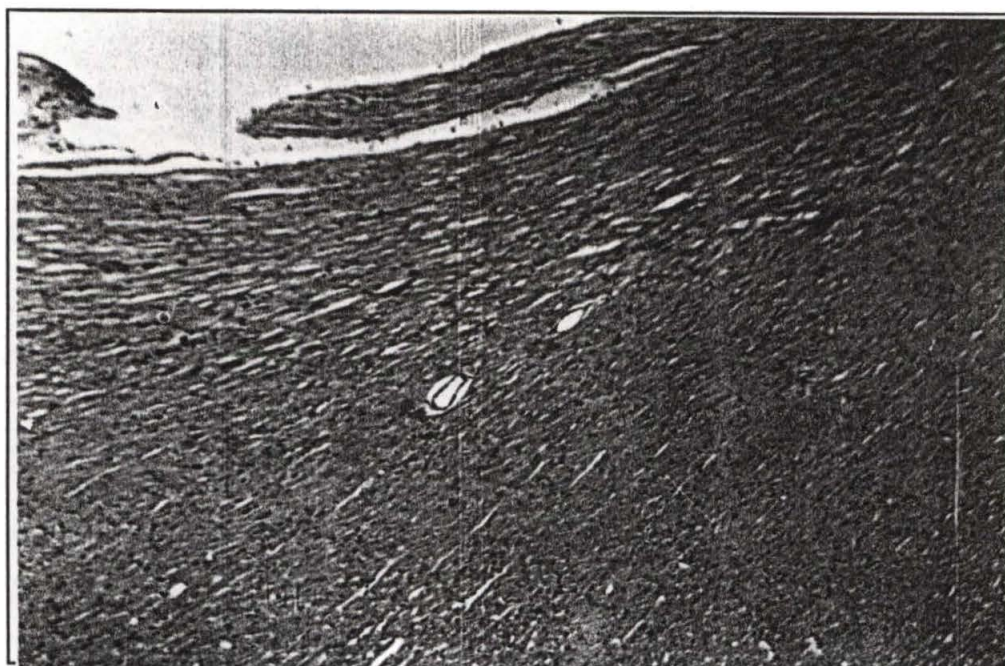


Fig. 23 - Corte histológico de coração, após 12 horas, não demonstrando alterações histopatológicas.

4.4.6 PÂNCREAS

Em todos os animais estudados encontrou-se exsudação neutrofílica, em tecido adiposo peripancreático.

A nível de gordura peripancreática encontrou-se ainda em animais após 08 horas de infecção, intenso exsudato neutrofílico além de múltiplos microabscessos conforme demonstrados nas figuras 24 A e B.

Entretanto, a nível de parênquima pancreático não foram evidenciadas alterações significantes.

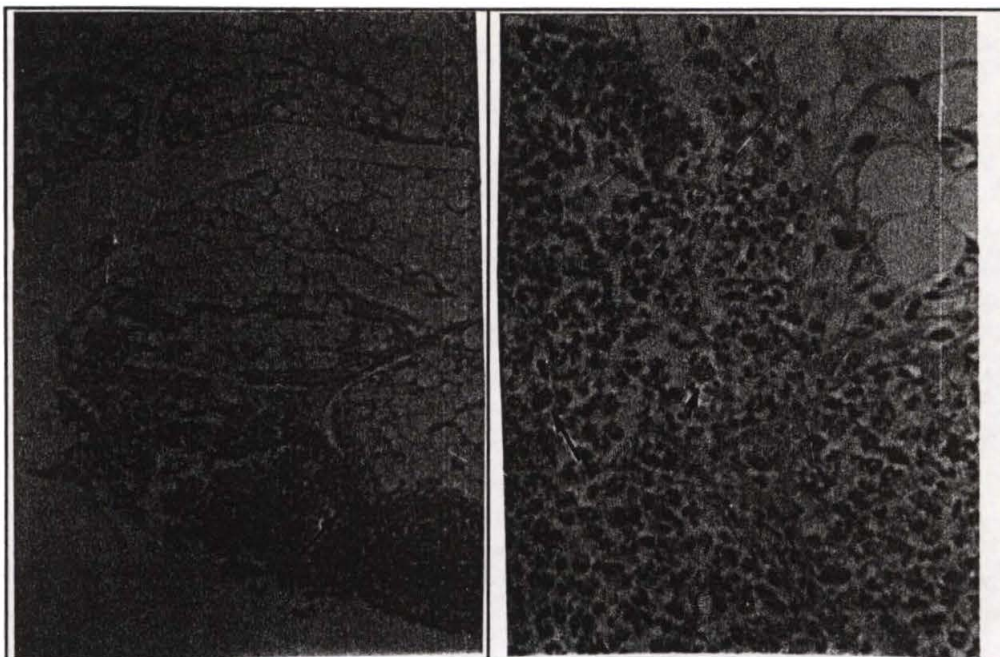


Fig. 24 A

Fig. 24 B

Fig. 24 A - Corte histológico de gordura peripancreática, após 08 horas, apresentando na fig. A: múltiplos microabscessos (→).

HE X 100

Fig. 24 B, detalhe de exsudato neutrofílico e macrófago (→).

HE X 400

As demais vísceras dos animais experimentais que receberam o inóculo bacteriano incluindo esôfago, estômago, intestino, rins, bexiga urinária, útero, ovários não apresentaram alterações histopatológicas acentuadas detectáveis por microscopia óptica. Apenas alterações como serosite aguda difusa em esôfago, estômago, intestino delgado foram encontradas, após decorridas mais de 04 horas de infecção. Do mesmo modo apenas nefrite intersticial aguda discreta, assim como pielite aguda moderada foram observadas em alguns animais.



5.0 DISCUSSÃO

5.0 DISCUSSÃO

Este capítulo será discutido abrangendo duas etapas: 1) a produção da peritonite e os assuntos correlatos, e 2) as alterações histopatológicas nos diversos órgãos estudados.

5.1 PRODUÇÃO DA PERITONITE

Baseado em estudos prévios, os quais motivaram a linha de pesquisa em infecção em cirurgia desenvolvida no Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, utilizou-se para esta tese um modelo cuja escolha do animal recaiu sobre ratos da raça Wistar. A literatura bem demonstra (RYAN et al., 1973; ONDERDONK et al., 1976; BROWNE et al., 1976) a possibilidade de se produzir peritonite difusa em ratos desta espécie, o qual permite comparação de grandes grupos de animais para melhor estudo estatístico. O custo de obtenção é baixo, o espaço físico para o seu alojamento requer apenas uma pequena área, e os cuidados específicos para seu controle e manutenção são mínimos. Outra vantagem que se pode constatar neste estudo, à semelhança dos acima descritos, é de que a utilização destes animais, para indução de sepse, não se requer grande experiência cirúrgica para seu manuseio, fato este já realçado por BROWNE et al. (1976, 1978).

Diversos autores, entretanto, utilizaram outros animais para padronização de modelos experimentais (KELLY, 1984). BURNET et al. (1957) apresentaram trabalho com porcos da Índia, admitindo serem os mesmos de fácil manuseio e com suscetibilidade à infecção bacteriana maior que à dos ratos. Observa-se como uma desvantagem incontestável em nosso meio a grande dificuldade da sua obtenção. Os autores que utilizaram o cão (CROOK et al., 1968; ROSSATO et al., 1971; SHARBAUGH et al., 1971), referem ser este um animal adequado para modelo, por possuir um volume da cavidade peritoneal superior a dos outros animais

de experimentação; como desvantagem, existe a dificuldade na obtenção de cães de uma mesma raça em quantidade suficiente, grande espaço físico em bioterios além de controle e manutenção trabalhosos.

Outro ponto importante a ser discutido, diz respeito ao inóculo bacteriano. As cepas bacterianas foram obtidas de amostras liofilizadas do *American Type Culture Collection* (Atlanta - USA), à semelhança de GUILGUEN (1992), onde se conseguiu uma efetiva padronização do inóculo. Quanto à escolha de cepas de *Escherichia coli*, deve-se ao fato de que é a responsável pelo desenvolvimento da maior parte das sepses por peritonite, com altas taxas de mortalidade, sendo este coliforme relacionado à mortalidade aguda (BARTLETT et al., 1978; ONDERDONK et al., 1976). Relatam ainda estes autores que os ratos os quais sobreviveram ao estágio de peritonite aguda, desenvolviam abscessos intra-peritoneais, sendo a bactéria responsável o *Bacteroides fragilis*. Ao contrário, nesta pesquisa não se detectou abscessos intra-cavitários, até porque todos os animais foram sacrificados nas primeiras 24 horas, tempo este insuficiente para se produzir tais complicações.

Vários autores preconizam modelos experimentais diversos. Dentre esses modelos existem os induzidos por fezes humanas em cápsulas de gelatina NICHOLS et al. (1978), fezes dos próprios animais BROWNE et al. (1976), ligadura de apêndice cecal com interrupção do suprimento sanguíneo CROOK et al. (1968). Porém entende-se que, não obstante factíveis de realização, o modelo utilizado neste trabalho, com bactérias previamente conhecidas, é melhor por ser reproduzido com fidelidade, de fácil padronização e ainda menos dispendioso que os acima referidos.

Observa-se, na literatura, que os autores os quais utilizaram culturas bacterianas na indução de peritonite, também se preocuparam em escolher bactérias que possuíssem linhagem conhecida (BROWNE et al., 1976), à semelhança deste estudo, exatamente com o objetivo de reprodução e padronização do inóculo.

O motivo da escolha do método de introdução do inóculo bacteriano para indução de peritonite foi o de realizá-lo através da punção percutânea da cavidade peritoneal, ao contrário do método utilizado por FREIRE et al. (1989) e BARTLETT et al. (1978), os quais induziram peritonite através de laparotomia e colocação de cápsulas, contendo bactérias e outros elementos. O método utilizado neste estudo é seguro, de fácil execução, não necessitando obrigatoriamente de anestesia prévia do animal, nem laparotomia, o que é plenamente corroborado por vários

outros autores (ANDERSON et al., 1989; STWEART et al., 1978; ROCHA, 1986).

Neste trabalho utilizou-se 38 ratos, os quais foram divididos inicialmente em dois grupos de 15 animais, além de 8 animais para o grupo de controle. O objetivo desta divisão foi o de realizar estudos de microscopia eletrônica e óptica. Nos animais dos grupos A e B, introduziu-se o inóculo bacteriano, ao contrário dos animais do grupo controle, que foram inoculados com solução de cloreto de sódio a 0,9% (02 animais) e com o meio de cultura sem bactérias (06 animais). Os resultados demonstram que, nos grupos A e B, produziu-se infecção peritoneal e sepse bem caracterizado, inclusive clinicamente, ao contrário dos animais do grupo controle, que não apresentavam dados clínicos, macroscópicos e microscópicos de peritonite. Os resultados demonstrados neste trabalho, referentes à produção de peritonite com inóculo bacteriano, e a não produção com cloreto de sódio a 0,9%, é bem ilustrada na literatura (BROWNE et al., 1976; GUILGUEN, 1992); porém, não se encontra referência quanto à inoculação apenas do meio de cultura, onde, à semelhança dos animais inoculados com cloreto de sódio a 0,9%, não apresentaram alterações clínicas macroscópicas e microscópicas compatíveis com peritonite e sepse.

Apesar de a maior parte da literatura consultada não se referir à variação de peso dos ratos submetidos à peritonite (ANDERSON et al., 1989, 1990; BARTLETT et al., 1978; MATLOW et al., 1989; STEWART et al., 1978), ela foi analisada neste trabalho, uma vez que se julgou poder o estado hipercatabólico decorrente da infecção peritoneal influenciar a perda ponderal. LAMBERT et al. (1965) citado por ARAÚJO Jr. (1987) demonstrou que os ratos em condições normais de confinamento apresentam um aumento ponderal, que oscila entre 3 e 5 gramas por dia. ARAÚJO Jr. (1987) refere que, em diversos grupos de ratos com peritonite, alguns animais não perderam peso, relatando que isto provavelmente se deveu à mortalidade precoce e não à infecção menos intensa ou à resistência individual dos animais. Já SAAD (1983), em seu modelo experimental de peritonite fecal em ratos, observou significativa redução de peso nos animais infectados, quando comparados aos que receberam solução fisiológica a 0,9% intracavitária.

Neste estudo pôde-se observar, conforme ilustrado nas tabelas 1, 2, 3, que os ratos dos grupos submetidos à infecção, somente 01 animal do grupo A e 01 do grupo B, apresentaram pequeno ganho de peso, ao contrário dos animais do grupo controle, onde 07 dos 08 ratos, apresentaram ganho de peso, sendo que o único animal deste grupo

que perdeu peso teve uma diminuição de apenas 01 grama. À semelhança de LAMBERT et al. (1965) e ARAÚJO Jr. (1987), observou-se que nenhum animal ganhou peso em virtude da agressão a que foram submetidos.

Outro aspecto importante mostrado diz respeito às observações clínicas dos animais, não obstante ser um método de avaliação subjetiva do quadro séptico de ratos com peritonite. Na revisão da literatura não se encontrou muitas referências relacionadas a estas observações.

Neste estudo os ratos foram observados através de avaliação clínica, dentro dos seguintes parâmetros:

- diminuição da atividade motora;
- redução na ingestão de água e ração;
- aumento dos movimentos respiratórios;
- formação de halo de coloração preta ao redor dos olhos (fig. 6);
- piloereção (fig. 7).

Todos estes parâmetros estiveram presentes de uma forma mais ou menos intensa, nos animais injetados com o inóculo bacteriano (grupos A e B), a partir da segunda hora pós inoculação; e de regra, quanto maior o tempo decorrido, mais intensa estas variáveis se encontravam. Ao contrário, nos animais do grupo controle, quer injetados com cloreto de sódio a 0,9%, quer inoculados com o meio de cultura, não se observou alterações clínicas compatíveis com quadro infeccioso.

Estes dados são semelhantes aos descritos por GUILGUEN (1992), MANENTI et al. (1990) e HENDRY et al. (1966), os quais, após produzir peritonite aguda em ratos, encontraram, em todos os animais a presença destes sinais associados ainda à taquipnéia com respiração superficial, à desidratação com urina concentrada e escura, em um intervalo de tempo que variou de duas a três horas após inoculação bacteriana. Relataram ainda os autores uma intensidade crescente destes sinais, até o momento do óbito.

Embora sendo difícil a mensuração dos dados clínicos e a não existência de metodologia fidedigna para sua execução, acredita-se serem estas observações importantes, por refletirem a morbidade dos animais submetidos à peritonite.

5.2 ALTERAÇÕES ANATOMO-PATOLÓGICAS VISCERAIS

Conforme descrito anteriormente, são poucas as publicações a nível nacional e internacional, relacionadas às avaliações microscópicas de vísceras abdominais e torácicas na vigência de sepse por peritonite aguda.

Este trabalho concentrou as avaliações das vísceras mais afetadas, dentro de uma linha de pesquisa, dando margem a que outras possam ser estudadas por outrem. Entendeu-se, nesta fase, ser importante primeiramente realizar análise por microscopia óptica e ultraestrutural de peritônio, com espécimens retirados da porção diafragmática. Isto se deve em função de ser esta região mais predisponente a dar passagem ao sistema linfático de líquidos, partículas e bactérias, para ulterior ação do sistema retículo-endotelial, conforme demonstradas em animais por MOALLI et al. (1987) e JONECKO (1989). As outras vísceras, referencialmente analisadas, fígado, coração, baço e pulmão são órgãos que a literatura tem demonstrado alterações anatomo-patológicas, na vigência da septicemia.

Tem-se que ressaltar a importância, neste estudo, da realização da técnica de fixação por perfusão intracardíaca, pois com ela se consegue viabilizar estudos microscópicos quer óptico quer ultraestrutural, sem comprometimento na análise dos resultados por artefatos de hipóxia terminal (TORRES et al., 1986, 1987).

Neste estudo, as observações microscópicas do peritônio parietal diafragmático encontrados nos animais do grupo controle, tanto os inoculados com cloreto de sódio a 0,9%, como aqueles com o meio de cultura, apresentavam-se composto por células mesoteliais achatadas, dispostas sobre camada de tecido conjuntivo frouxo, morfologia esta, similar e bem definida na microscopia óptica e eletrônica por vários autores (ESKELAND et al., 1966; RYAN et al., 1973; ANDERSON et al., 1989).

Como se pode observar na tabela 4, os animais infectados apresentavam desde alterações discretas como a hiperplasia mesotelial até alterações mais evidentes como focos de exudação neutrofilica com deposição de fibrina; sendo o intervalo de tempo fator preponderante para uma menor ou maior resposta inflamatória.

À semelhança de autores como (MACKANESS, 1962; NORTH et al., 1963; HARD et al., 1966; HENDRY et al., 1966; DAYAL et al., 1991), este estudo apresenta, não só à microscopia óptica (fig. 8), como também à microscopia eletrônica (fig. 10), um início de resposta inflamatória bem evidente, já nas primeiras 04 horas, ao contrário de estudos realizados por MacCALLUM (1982), o qual relata que, do ponto de vista histológico, resposta inflamatória aguda foi notada em tecidos somente após 12 horas de infecção.

Um detalhe histológico, que bem relacionou neste estudo a evolução das alterações anátomo-patológicas com o tempo decorrido de infecção, é demonstrado na figura 24-A, onde se vê corte histológico de gordura peripancreática apresentando múltiplos microabscessos decorrido 08 horas da introdução do inóculo bacteriano.

O presente trabalho demonstra ainda, conforme BEISEL (1990) e SILVA (1991), que os macrófagos estão presentes precocemente na resposta inflamatória fagocitando bactérias. Quando vistos à microscopia eletrônica, manifestam tipicamente bactérias ou material fagocitado em fagossomos, apresentando também retículo endoplasmático rugoso e aparelho de Golgi mais proeminente.

Os efeitos inflamatórios da peritonite aguda provocados pelo inóculo bacteriano, constituído de *Escherichia coli* e *Bacteroides fragilis* embora bem realçados clínica e microscopicamente, não apresentaram uma resposta tão intensa, no que diz respeito aos seus constituintes celulares. Isto poderia ser perfeitamente explicado pelos trabalhos elaborados por ANDERSON et al. (1989 e 1990), os quais demonstram que os efeitos inflamatórios da peritonite por *Escherichia coli* são grandemente realçados na presença de bile, tendo estes autores encontrado, em seus estudos microscópicos, alterações morfológicas que bem embasam estas afirmações.

Quanto à distribuição das organelas citoplasmáticas (mitocôndrias, retículo endoplasmático, complexo de Golgi), assim como os vacúolos fagocíticos, não se observou, ao longo dos diversos estágios de infecção, nenhuma diferenciação que pudesse estabelecer um critério para se determinar o grau de peritonite.

Dentre as vísceras propostas para o estudo, o fígado foi, ao lado do peritônio diafragmático, a que mais detalhadamente analisou-se. HERSHEY (1964), citado por BOGOSSIAN (1976), qualifica o sistema

hepático como um dos órgãos críticos na patogênese da sepse, devido ser um dos mais nitidamente envolvidos pelas alterações morfológicas e hemodinâmicas. POOL et al. (1971), evidenciaram em experimentos realizados em macacos submetidos a choque séptico por *Escherichia coli* uma maior susceptibilidade do fígado, o qual exibia alterações não ocorridas nos rins, pulmões e coração, dos mesmos animais.

Os resultados desta pesquisa mostram, nos animais do grupo controle, alterações de coloração condizentes com dificuldade de perfusão tecidual adequada, porém, sem repercussão da preservação histológica, em todos os animais. Demonstrou-se, ainda, discreta portite crônica em 02 casos, discreto infiltrado neutrofílico centro-lobular e sinusoidal em apenas 01 caso e alterações discretas e inespecíficas sem relação com este experimento.

Nos animais submetidos à infecção peritoneal aguda, os estudos apresentaram alterações tanto em parênquima como em cápsula hepática. Conforme ilustrado pelas figuras 14 e 15, as alterações hepáticas apresentaram desde um mínimo exsudato neutrofílico sinusoidal, ocorrido 02 horas após injeção do inóculo bacteriano, até a formação de microabscessos, com necrose de hepatócitos, uma vez transcorrido maior tempo de infecção.

Estes achados são corroborados por HENDRY et al. (1966), os quais, estudando as alterações morfológicas e bioquímicas em ratos submetidos à inoculação intraperitoneal, de uma mistura letal de *Escherichia coli* e hemoglobina, concluíram que o órgão mais notadamente afetado foi o fígado, tendo as alterações hepáticas se apresentado com áreas de necrose bem evidentes, decorridas 04 horas da inoculação.

Ao contrário, MacCALLUM et al. (1982), realizando estudos microscópicos em espécimen de fígado de ratos, após infecção promovida por injeção intraperitoneal de *Bacteroides melaninogenicus* e *Fusobacterium necrophorum*, concluíram que, do ponto de vista histológico, neutrófilos foram notados somente após 12 horas do início da infecção.

Exaustivos trabalhos experimentais realizados por LILLEHEY et al. (1964), citado por BOGOSSIAN (1976), em cães submetidos à septicemia, também revelaram algumas alterações hepáticas, tais como a congestão e necrose em torno da veia centro-lobular.

MANENTI et al. (1990), estudando espécimens de fígado de ratos, após indução de peritonite aguda, observaram que as primeiras alterações ocorreram em 06 horas, sendo elas, a congestão e a dilatação da veia centro-lobular e dos sinusóides, além de edema do espaço de Disse. Relatam ainda os autores que, ao final da 24ª hora de infecção, encontraram hipertrofia difusa das células de Kupfer, porém sem a presença de microabscessos, ao contrário de nosso estudo, conforme bem ilustrado na figura 17.

Sabemos que o Sistema Retículo-Endotelial (S.R.E.), experimenta severas interferências em suas atividades durante o choque septicêmico, que culminam por grave depressão de suas funções. Noções de ultraestrutura capilar revelam que as células endoteliais de um grupo de capilares descontínuos é que constitui o S.R.E., e se situam preferentemente na árvore circulatória do fígado, gânglios linfáticos e baço. Como é do conhecimento geral, o S.R.E. é o mais importante componente de defesa do organismo pois, suas células, espreitam, fagocitam e destroem as bactérias e quaisquer substâncias anormais ou estranhas que se apresentem na corrente sanguínea ou nos espaços teciduais próximos. Eles realizam uma verdadeira limpeza fagocitária nestes locais. Entendeu-se como importante, à semelhança do que ocorreu no fígado, realizar também as avaliações do baço.

Os resultados do estudo dos achados esplênicos demonstram, muito bem, a ausência de alterações anátomo-patológicas, em todos os animais do grupo controle.

Ao contrário, nos ratos infectados, encontrou-se desde serosite aguda multi-focal discreta até graus acentuados de processo inflamatório.

Um dos animais sacrificados, com 12 horas pós inoculação, apresentou intensa exsudação com formação de abscesso e áreas de necrose, além de difusa hiperplasia mesotelial.

Estas alterações são corroboradas por HENDRY et al (1966), os quais observaram, em ratos sacrificados no mesmo intervalo de tempo, necrose de tecido linfático no baço e linfonodos. Da mesma maneira MacCALLUM et al (1982), após estudos microscópicos em espécimens de baço de ratos, apresentaram infiltrado celular inflamatório agudo, após 12 horas de infecção.

MANENTI et al. (1991) descreveram alterações histológicas, a partir de 06 horas, período este em que já se encontrava baço aumentado de tamanho, com congestão e dilatação de sinusóides venosos; sendo que a intensa atividade macrofágica no baço e linfonodos abdominais era tanto mais acentuada quanto maior o tempo de infecção.

A literatura demonstra a existência de relações estruturais importantes entre a cavidade pleural e peritoneal e, especialmente nos linfáticos do diafragma, há uma relação muito íntima pois, a rede linfática sub-peritoneal deságua, em parte, nos gânglios supradiafragmáticos e a rede superior ou sub-pleural desemboca, em parte, nos gânglios intra-abdominais.

Os vasos sub-pleurais e sub-peritoneais do diafragma também se intercomunicam livremente por meio de troncos perfurantes. Não deve causar surpresa, pois, a verificação clínica da concomitância de infecções abdominais e torácicas.

O exposto acima, por si só, justifica os estudos relacionados às alterações pulmonares no animal com peritonite. Embora o pulmão não sofra habitualmente distúrbios circulatórios muito intensos no choque séptico, o fato de ser órgão responsável por função vital, faz com que mesmo as alterações de pequena monta tenham conseqüências graves. A pobreza em alfa-receptores e a predominância de capilares contínuos na circulação pulmonar, a tornam menos susceptível à intensa estimulação adrenérgica, abrandando as alterações microcirculatórias e suas repercussões. Em determinadas condições, entretanto, podem ser intensamente comprometidas na sepse, com significativas alterações hemodinâmicas e morfológicas.

GEMER et al. (1973), após estudos em coelhos submetidos a choque endotóxico por bactérias gram-negativas, observaram alterações morfológicas, tais como congestão pulmonar, edema intersticial e alveolar, hemorragia intra-alveolar além de eventual degeneração de células alveolares.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstraram nos espécimens de pulmão, removidos dos animais do grupo controle, discreta hemorragia intra-alveolar, provavelmente provocada pela perfusão tecidual, ao contrário dos animais infectados onde se encontrou alterações morfológicas, que variaram de um discreto exsudato neutrofílico em capilares de septos pulmonares a focos difusos de intensa exsudação

neutrofílica intra-alveolar, com deposição de fibrina e formação de áreas pneumônicas.

Observa-se na tabela 6, que os animais que apresentaram as alterações mais acentuadas foram os sacrificados com 04, 08 e 12 horas.

Alguns destes achados, embora possam ser semelhantes ao de autores citados anteriormente, não coincidem com outros estudos, HENDRY et al. (1966), inoculando intraperitonealmente em ratos mistura letal de *Escherichia coli* e hemoglobina, não relatam alterações anátomo-patológicas freqüentes em pulmões. Também MANENTI et al. (1991), após produção de peritonite aguda em ratos e sacrifício dos animais respectivamente após 06, 12 e 18 horas do início do experimento, não observaram alterações morfológicas nos pulmões, ao contrário da intensa atividade macrofágica encontrada em outros órgãos (fígado, baço e linfonodos).

Em relação ao coração estudos não tão recentes, embora já com utilização da microscopia eletrônica realizados por SHUMER et al. (1971), mostraram nítidas alterações ultraestruturais das mitocôndrias cardíacas na septicemia tais como edema e rotura das mesmas, muito bem ilustradas através das fotomicrografias, comparadas com mitocôndrias cardíacas normais.

Também HENDRY et al. (1966), já haviam demonstrado, em ratos com peritonite, ocasionais alterações necróticas em miocárdio, assim como em outros órgãos (rim, fígado, baço e intestino); relatam ainda, os referidos autores, que estas alterações foram mais pronunciadas entre 08 e 12 horas de infecção.

Contrariando a literatura acima relatada, este estudo, embora com utilização apenas de microscopia óptica, demonstra que, tanto nos animais do grupo controle como nos infectados, não se evidenciou alterações morfológicas miocárdicas relevantes.

O autor deste trabalho gostaria de finalizar deixando a mensagem da importância da continuidade desta pesquisa, com o objetivo de se realizar observações morfológicas, em fase mais tardias da peritonite, onde possivelmente as vísceras que não apresentaram alterações significantes, teriam plenas condições de fazê-las. Ainda dentro

DISCUSSÃO

dos objetivos dos novos estudos, entende o autor, ser de interesse as avaliações bioquímicas e hematológicas, correlacionando-as com as alterações morfológicas nos diversos períodos de infecção, os quais certamente poderão proporcionar maiores esclarecimentos quanto a fisiopatologia da peritonite e sepse experimental em ratos.



6.0 CONCLUSÕES

6.0 CONCLUSÕES

É possível concluir, com base nas análises feitas que:

1. A suspensão composta de $2,8 \times 10^9$ UFC/ml de *Escherichia coli* + $1,33 \times 10^9$ UFC/ml de *Bacteroides fragilis* produz peritonite aguda em ratos Wistar na dosagem de 1 ml por 100 g de peso.

2. Todos os animais injetados com inóculo bacteriano apresentaram alterações clínicas compatíveis com infecção.

3. Os animais inoculados com solução salina de cloreto de sódio a 0,9% e o meio de cultura não apresentaram alterações clínicas.

4. Os animais infectados apresentaram significativa diferença ponderal dos dados obtidos no momento da inoculação e no sacrifício.

5. Nas vísceras, dos ratos do grupo controle, não foram observadas alterações histopatológicas.

6. O peritônio diafragmático dos animais infectados apresentou, ao estudo por microscopia óptica, alterações que variaram de discreta hiperplasia mesotelial até alterações mais evidentes como peritonite com focos de exsudação neutrofílica e deposição de fibrina.

7. Os animais estudados por microscopia eletrônica apresentaram ultraestruturalmente macrófagos e vacúolos fagocíticos, contendo bactérias, em uma fase mais adiantada da infecção.

8. Os animais estudados por microscopia óptica apresentaram microabscessos intra-hepáticos com destruição e necrose de cordões hepatocíticos, os quais, atingiram o máximo com 12 e 24 horas de infecção.

CONCLUSÕES

9. As alterações observadas nos pulmões dos animais, estudados por microscopia óptica, variaram de um exsudato neutrofilico discreto de septos pulmonares a focos difusos de broncopneumonia.



**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMDHAL, S. M.; BOGWALD, J. et al. Treatment of experimental peritonitis in rat by transfer of peritoneal mononuclear cells from rats injected with semisoluble aninadet glucan. **Acta Chir. Scand.**, Stockholm, v. 153, p. 535-539, 1987.
- ANDERSSON, R.; TRANBERG, K. G. et al. Factors influencing the outcome of *Escherichia coli* in rats. **Acta Chir. Scand.**, Stockholm, v. 155, p. 155-157, 1989.
- ANDERSSON, R.; TRANBERG, K. G. et al. Influence of individual bile acids in *Escherichia coli* peritonitis. **Scand. J. Gastroenterol.**, Oslo, v. 25, p. 1129-1136, 1990.
- ANDERSSON, R.; TRANBERG, K. G. et al. Roles of bile and bacteria in biliarey peritonitis. **Br. J. Surg.**, Cuilford, v. 77, p. 36-39, 1990.
- ANDERSSON, R.; WILLÉN, R. et al. Effect of bile on peritoneal morphology in *Escherichia coli* peritonitis. **Scand. J. Gastroenterol.**, Oslo, v. 25, p. 405-407, 1990.
- ARAÚJO, JR. J. C. Avaliação do uso tópico da clorhexidina na peritonite fecal induzida em ratos. **Acta cir. bras.**, São Paulo, v. 2, n. 2, p. 55-63, 1987.
- AZEVEDO, N.; SOLANO, C. et al. Peritonites. In: GALVÃO, L. **Cirurgia do aparelho digestivo**. 1ª. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1978, p. 301-311.
- BARTLETT, J. G.; ONDERDONK, A. B. Lessons from an animal model of intraabdominal sepsis. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 113, p. 853-857, July 1978.

- BEESELY, R.A.; DANIEL, P.M. A simple method for preparing serial blocks of tissue. **J. Clin. Pathol.** London, v. 9, p. 267-286, 1956.
- BEISEL, W. R. Intestinal aspects of acute phase reaction. **J. Lab. Clin. Med.**, St Louis, v. 115, n. 6, p. 652-53, 1990.
- BOGOSSIAN, L. **Choque**. 3. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1976.
- BROWNE, M. K.; LESLIE, G. B. Animal models of peritonitis. **Surg. Gynecol. Obstet.**, Chicago, v. 143, p. 738-740, Nov. 1976.
- BROWNE, M. K.; LESLIE, G. B. et al. A comparison of noxythiolin and povidone-iodine in experimentally induced peritoneal infection in mice. **Br. J. Surg.**, London, v. 65, p. 601-601, 1978.
- BURNETT, W. E.; BRONWN JR, G. R. et al. The treatment of peritonitis using peritoneal lavage. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 145, n. 5, p. 675-862, May 1957.
- CAMERON, G.R.; HASSAN, S.M. et al. Repair of Glisson's capsule after tangential wounds of the liver. **J. Pathol. Bact.** v. 73, p. 1-3, 1957.
- CANFIELD, P. J. Chronic peritonitis and pancreatitis in a koala (*Pascolarctos cinereus*). **J. Comp. Pathol.**, Liverpool, v. 96, n. 4, p. 469-472, July 1986.
- CHIN, K. N.; HUDSON, G. Ultrastructural changes in murine peritoneal cells following cyclophosphamide administration. **Br. J. Exp. Pathol.**, Sheffield, v. 55, n. 6, p. 554-561, 1974.
- CROOK, J. N.; COTLAR, A. M. et al. Intraperitoneal cephalotin in the treatment of experimental appendiceal peritonitis. **Am. Surg.**, Philadelphia, v. 34, n. 10, p. 736-739, Oct. 1968.
- CURRAN, R.C.; CLARK A. E. Phagocytosis and fibrogenesis in peritoneal implants in the rats. **J. Pathol. Bact.** v. 88, p. 489-491, 1964.
- DAVID, G.B.; MALLION, K. B. et al. A method of silvering the "Golgi apparatus" in paraffin sections of the central nervous system of vertebrates. **Quarterly Journal Microscopic Science.**, v. 101, p. 207-221, 1960.

DAVIS, J. H. Current concepts of peritonitis. **Am. Surg.**, Philadelphia, v. 33, p. 673, 1967.

DAYAL, Y.; DELELLIS, R.A. Trato gastrointestinal-peritônio. In: ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional.**, 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p. 744-745.

ESKELAND, G.; KJAERHEIM, A. Regeneration of parietal peritoneum in rats. **Acta Pathol. Microbiol.**, Copenhagen, v. 68, p. 379-395, 1966.

FILLIBEN, J. J. The probability plot correlation coefficient test for normality. **Technometrics.**, v. 17, p. 11-117, 1975.

FOTEV, Z.; WHITAKER, D. et al. Role of macrophages in mesothelial healing. **J. Pathol.**, Chichester, v. 151, p. 209-219, 1987.

FOWLER, R. Primary peritonitis: changing aspects. **Aust. Paediatr.**, Melbourne, v. 7, n. 73, p. 1956-1970, 1971.

FREIRE, A. N. M.; KOBATA, C. M. et al. Método de abscesso crônico, intraperitoneal em ratos. **Acta cir. bras.**, São Paulo, suplemento 1, p. 19-20, 1989.

_____. Infecção peritoneal experimental em ratos. **Acta cir. bras.**, São Paulo, suplemento 1, p. 20, 1989.

_____. Sepsémia em peritonite generalizada experimental. **Acta cir. bras.**, São Paulo, suplemento 1, p. 20-21, 1989.

_____. Formação de abscesso experimental em ratos. **Acta cir. bras.**, São Paulo, suplemento 1, p. 19, 1989.

FUKUSAWA, M.; CAMPEAN, J. D. et al. Regulation of proliferation of peritoneal tissue repair cells by peritoneal macrophages. **J. Surg. Res.**, New York, v. 49, p.81-87, 1990.

GEMER, M.; HAYES, J.A. et al. Functional and structural changes in the lung of rabbits with endotoxemia. **Surg. Gynecol. Obst.**, Chicago, v. 137, p. 975-978, 1973.

- GUILGEN, G.A. **Peritonite infecciosa com quantitativos e qualitativos bacterianos conhecidos**: modelo experimental em ratos., Curitiba, 1992. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.
- HARD, G. C. Electron microscopic study of the differentiation of mouse peritoneal macrophages stimulated by *corinebacterium ovis* infection. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 21, n. 4, p. 309-315, 1969.
- HENDRY, W.S.; SLEEMAN, H.K. et al. Pathophysiology of experimental peritonitis in the rat. **Exp. Med. Surg.**, New York, v. 24, n.4, p. 303-312, 1966.
- JONECKO, A. Das menschliche peritoneum und die menschliche peritonitis in ultrastrukturellen und immunhistochemischen untersuchungen. **Z. Mikrosk. Anat. Forsch**, Leipzig, v. 104, n. 6, p. 907-943, 1990.
- KARNOVSKY, M.J. A formaldehyde - glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use i electron microscopy. **Journal of Cell Biology**., v. 27, p. 137-139, 1965.
- KELLY, M. J. A guine-pig model demonstrating sinergy between *Escherichia coli* and *Bacteroides fragilis* in infected surgical wounds. In: HILL M. J. (Ed.). **Models of Anaerobic Infection**, DORDRECHT: Nartimis Nijhoff, 1984.
- LOPES, R.L.C.; ROCHA, P.R.S. Peritonites. In: ROCHA, P.R.S.; ANDRADE, J.N. et al. **Abdômen agudo - Diagnóstico e tratamento**. 7ª. ed. Rio de Janeiro, Medsi, 1993. p. 243-54.
- LU, W.H.M.; WILLIAMS, D.M. The modulation of inflammatory response in the peritoneal cavity through stimulation of the pleural cavity: an experimental study in the rat. **Br. J. Exp. Pathol.**, London, v. 61, n.5, p.540-543, Oct. 1980.
- MACKANESS, G. B. Cellular resistance to infection. **J. Exp. Med.**, New York, v. 116, p. 381-406, Mar. 1962.
- MANENTI, A.; BOTTICELLI, A. et al. Hepatic histological lesion during acute experimental peritonitis in the rat. **Pathologica**, Genoa, v. 82, p. 435-439, 1990.

- MANENTI, A. BOTTICELLI, A. et al. Splenic morphological changes in acute peritonitis: Experimental observations in rats. **Pathologica**, Genoa, v. 83, p.65-68, 1991.
- MATLOW, A. G.; BOHNEN, J. M. A. et al. Pathogenicity of Enterococci in a rat model of fecal peritonitis. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 160, n. 1, p. 142-145, July 1989.
- MCCALLUM, R. E.; ROHRER, M. D. et al. Histopathology of mixed anaerobic intraabdominal infection in mice. **Klin. Wochenschr.**, Berlin, v. 60, p. 702-704, 1982.
- MOALLI, P.A.; MacDONALD, J.L et al. Acute injury and regeneration of the mesothelium in response to asbestos fibers. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v.128, p. 426-444, 1987.
- NICHOLS, R. L.; SMITH, J. W.; BALTHAZAR, E. R. Peritonitis and intrabdominal abscess: an experimental model for the evaluation of human disease. **J. Surg. Res.**, New York, v. 25, p. 129-134, 1978.
- NORTH, R. J.; MACKANESS, G. B. Electronmicroscopical observations on the peritoneal macrophages of normal mice and immunised with listeria monocytogenes. **Br. J. Exp. Pathol.**, Scheffield, v. 44, n. 6, p. 608-611, Apr. 1963.
- OHLSSON, K. Collagenase and elastase released during peritonitis re complexed by plasma protease inhibitors. **Surgery**, St. Louis, v. 79, n. 6, p. 652-657, June 1976.
- ONDERDONK, A. B.; BARTLETT, J. G. et al. Microbial synergy in experimental intrabdominal abscess. **Infect. Immun.**, Washington, v. 13, p. 22-26, Jan. 1976.
- POGGETTI, R. S.; BRANCO, P. D. Peritonites difusas. In: SPERANZINI, M. B.; OLIVEIRA, M. R. **Manual do residente de cirurgia**. 3ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, p. 178-183.
- POLL, J.L.; OWEN, S.F. et al. Response of subhuman primate in Gram-negative septicemia induced by live *Escherichia coli*. **Surg. Gyn. Obst.**, Chicago, v.132, p. 469-471, 1971.

- POWELL, R. J.; MACHIEDO, G. W. et al. Effect of oxigen-free radical scavengers on survival in sepsis. **Am. Surg.**, Philadelphia, v. 57, p. 86-88, Feb. 1991.
- RAFTERY, A.T. Regeration of parietal and visceral peritoneum in the immature animal: a light and electron microscopical study. **Br. J. Surg.**, Guildford, v. 160, n.12, p.969-975, Dec. 1973.
- ROCHA, J. J. R. Infecção peritoneal modelo experimental em cobaias. **Acta cir. bras.**, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 12-20, 1986.
- ROSSATO, E. F.; JEFFREY, C. et al. Peritoneal lavage treatment in experimental peritonitis. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 175, n.3, p. 384-387, Mar. 1972.
- RYAN, G.B.; GROBETY, J. et al. Mesothelial injury and recovery. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 71, n. 1, p. 93-102, Apr. 1973.
- SAAD, F. Infecção peritoneal modelo experimental em ratos. **Acta cir. bras.**, São Paulo, v. 1, p. 10-18, 1986.
- SANTOS, A.B.; SOUZA, W. Surface charge and ultrastructure of the cell surface of resident and thioglycolate-licited mouse peritoneal macrophages. **J. Submicrosc. Cytol.**, Bologna, v. 15, n. 4, p. 897-911, 1983.
- SHARBAUGH, R. J.; RAMBO, W. M. A new model for producing experimental fecal peritonitis. **Surg. Ginecol. Obstet.**, Chicago, v. 133, p. 843-845, Nov. 1971.
- SHUMER, W.; ERVE, P.R.; OBERNOLTE, R.P. Endotoxemic effect on cardiac and skeletal musclemitochondria. **Surg. Gyn. Obst.**, Chicago, v. 133, p.433-437, 1971.
- SILVA, M.E.D. Tecido conjuntivo frouxo e tecido adiposo. In: CORMACK, D.H. **Ham histologia.**, 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.125-149, 1991.
- SISEL, R. J.; DONOVAN, A. J. et al. E. Experimental fecal peritonitis. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 104, p. 765-768, June 1972.

- STEWART, D. J.; MATHENSON, N. A. Peritoneal lavage in fecal peritonitis in the rat. **Br. J. Surg.**, London, v. 65, p. 57-59, 1978.
- SUTTON, J.S.; WEISS, L. Transformation of monocytes in tissue culture into macrophages, epithelioid cells and multinucleated giant cells. An electron microscope study. **J. Cell Biol.**, v. 28, p. 303-305, 1966.
- TORRES, L.F.B. **Muscle, motor end-plate and nerve in hereditary and experimental myopathies in the mouse.** London, 1986. Tese (Doutorado) - Institute of Neurology, The National Hospital.
- TORRES, L.F.B.; DUCHEN, L.W. The mutant *mdx*: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. **Brian**, London, v. 110, p. 269-299, 1987.
- VARY, T. C.; SIEGEL, J. H. et al. Role of anaerobic bacteria in intra-abdominal septic abscesses in mediating septic control of skeletal muscle glucose oxidation and lactic acidemia. **J. Trauma**, Baltimore, v. 29, n. 7, p. 1003-1004, 1989.
- WATTERS, W.B.; BUCK, R.C. Scanning electron microscopy of mesothelial regeneration in the rat. **Lab. Invest.**, Baltimore, v. 26, n.5, p. 604-609, 1972.
- WEINSTEIN, W. M.; ANDREW, O. B. et al. Experimental intra-abdominal abscesses in rats: development of an experimental model. **Infect. Immun.**, Washington, v. 10, n. 6, p. 1250-1255, Dec. 1974.
- WEINSTEIN, W. M.; ONDERDONK, A. B. et al. Antimicrobial therapy of experimental intraabdominal sepsis. **J. Infect. Dis.**, Chicago, v. 132, n 3, p. 282-286, Sept. 1975.