

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
CURSO DE CLÍNICA CIRÚRGICA**

**PERITONITE AGUDA EXPERIMENTAL EM RATOS  
MODELO DE BLOQUEIO TRANSDIAFRAGMÁTICO COM MEMBRANA  
CELULÓSICA**

**CURITIBA  
2006**

**LEONIDAS NORONHA SILVA**

**PERITONITE AGUDA EXPERIMENTAL EM RATOS  
MODELO DE BLOQUEIO TRANSDIAFRAGMÁTICO COM MEMBRANA  
CELULÓSICA**

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

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Simões

**CURITIBA  
2006**

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais Abelardo e Maria Aparecida pela dedicação, compreensão e eterna demonstração de amor.

Aos meus irmãos Moema e Marcelo, e a Sônia minha esposa, pela amizade e estreito laço de amor que nos une.

À Dra. Eliza Checchia Noronha, minha avó, médica fundadora do Hospital e Maternidade Santa Brígida e incansável batalhadora por melhorias sociais no Estado do Paraná.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. JOÃO CARLOS SIMÕES, meu orientador, pela amizade e seriedade com que se dedica à vida acadêmica.

Ao Prof. Dr. OSVALDO MALAFAIA, coordenador do Curso de Pós-Graduação, por sua postura solícita e pelo incentivo à pesquisa na área médica.

Ao Dr. AGOSTINHO CHECCHIA NORONHA, meu tio e amigo, pela fundamental contribuição no estudo e preparo das suspensões bacterianas, demonstrando uma vez mais sua dedicação e formação profissional.

Aos acadêmicos JOÃO FRANCISCO LEMOS GONDEK, LUCIANA BERTOLI ESMANHOTTO E ANA PAULA MARTINS SEBASTIÃO, pela amizade e colaboração na realização deste trabalho científico.

Ao Dr. ANTÔNIO V. MALUCELLI, pelo forte laço de amizade e importante auxílio na realização da documentação fotográfica.

À Prof. Dra. SUELI RUIZ GIOLO, professora assistente do Departamento de Estatística da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração e interpretação dos dados para análise estatística.

Aos meus amigos, NILSON SANTOS, MARIA BRÍGIDA (in memoriam), NILSON JOSÉ, JOSÉ OLÍMPIO, JOÃO AMIR, RUTE (in memoriam) e MARCOS GADOTTI, pela marcante participação na formação da minha personalidade.

Ao Prof. Dr. CARLOS ROBERTO DE REZENDE MIRANDA, pesquisador e amigo, pela garra e incentivo para iniciação deste trabalho científico.

Ao Sr. CÂNDIDO, responsável pelo Biotério da Universidade Federal do Paraná, pela contribuição no fornecimento dos animais de experimentação.

Ao Sr. MARCELO T. MALAFAIA, pela orientação e trabalho realizado na editoração desta tese.

À Dra. PAULA SCHIMIDT SIQUEIRA, pela análise e interpretação de microscopia óptica.

Às Srtas. DANIELA AGUIAR CORREIA e LILIAN KELLY DOS SANTOS, pela colaboração na tradução para a língua inglesa.

À Prof<sup>a</sup>. MARIA TEREZINHA KNABBEN, pelo carinho e auxílio na correção da língua portuguesa.

À sra. EDILAINE ARAÚJO DOS SANTOS, secretária do Curso de Pós-Graduação, pelo apoio operacional durante a realização deste trabalho.

À Sra. AUREA MARIA COSTIN, bibliotecária da Biblioteca de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela colaboração e revisão das referências bibliográficas.

Ao CNPq, pelo privilégio de poder atuar como bolsista dessa respeitável instituição e, assim, contribuir para a área de pesquisa médica.

*“O único progresso verdadeiro é o progresso moral. O resto é simplesmente ter mais ou menos bens”.*

José Saramago

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	6
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	7
<b>LISTA DE GRÁFICOS</b> .....	8
<b>RESUMO</b> .....	9
<b>ABSTRACT</b> .....	10
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	13
2.1 DA INDUÇÃO DE PERITONITE .....	13
2.2 DA ABSORÇÃO TRANSDIAFRAGMÁTICA .....	16
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	19
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	19
3.2 TÉCNICA DO BLOQUEIO DIAFRAGMÁTICO COM COLOCAÇÃO DA MEMBRANA CELULÓSICA .....	19
3.3 PREPARO DA SUSPENSÃO BACTERIANA .....	21
3.4 TÉCNICA DE INOCULAÇÃO DA SUSPENSÃO BACTERIANA .....	21
3.5 IDENTIFICAÇÃO E CONTROLE DOS ANIMAIS .....	22
3.6 OBSERVAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS NO PERÍODO PÓS-INDUÇÃO DE PERITONITE .....	22
3.7 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS .....	22
3.8 OBSERVAÇÃO MACROSCÓPICA .....	23
3.9 COLETA DO MATERIAL .....	23
3.10 METODOLOGIA ESTATÍSTICA .....	24
<b>4 RESULTADOS</b> .....	25
4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA NO PERÍODO PÓS-INDUÇÃO DE PERITONITE .....	25
4.2 AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE .....	25
4.3 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA CAVIDADE PLEURAL .....	26
4.4 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA CAVIDADE ABDOMINAL .....	26
4.5 ESTUDO BACTERIOLÓGICO DO DERRAME PLEURAL .....	29
4.6 ESTUDO BACTERIOLÓGICO DAS PUNÇÕES INTRACARDÍACAS .....	30
4.7 COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DOS GRUPOS DE ANIMAIS ....	30

<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	33
5.1 ESCOLHA DO ANIMAL .....	33
5.2 INÓCULO BACTERIANO .....	33
5.3 DILUIÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO .....	34
5.4 DA INOCULAÇÃO .....	34
5.5 DOS GRUPOS DE ANIMAIS .....	35
5.6 DA OBSERVAÇÃO CLÍNICA .....	35
5.7 DA MORTALIDADE .....	36
5.8 OBSERVAÇÃO DA CAVIDADE ABDOMINAL.....	36
5.9 DERRAME PLEURAL .....	37
5.10 DO ESTUDO BACTERIOLÓGICO .....	38
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	40
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	41
<b>ANEXOS</b> .....	45



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Exposição da superfície peritoneal diafragmática após secção do ligamento falciforme do fígado .....	20
Figura 2 - Exposição da superfície peritoneal diafragmática após colocação da membrana celulósica - Biofill. (-) .....	20
Figura 3 - Realização de punção intracardíaca a céu aberto .....	23
Figura 4 - Presença de aderência da superfície hepática e epíplon ao peritônio diafragmático. (-) .....	27
Figura 5 - Microfotografia representada por músculo diafragmático (MO) tendo aderido cápsula de granuloma representada por fibrose (F), tecido de granulação (TG) e necrose celular (N). (H.E. x 40) .....	27
Figura 6 - Microfotografia representada por tecido hepático (TH) tendo aderido fibrose (F) e tecido de granulação (TG). (H.E. x 100) .....	28

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Incidência de sobreviventes e óbitos nos grupos de animais antes de 12 horas .....	25
Tabela 2 – Incidência de sobreviventes e óbitos nos grupos de animais entre 13-48 horas .....	26
Tabela 3 – Incidência de derrame pleural nos grupos de animais .....	28
Tabela 4 – Relação, entre os animais que foram a óbito, na presença de peritonite difusa, de abscesso intraperitoneal, de aderências peritoneais e de derrame pleural .....	28
Tabela 5 – Relação entre os grupos de animais, número de derrames pleurais e bactéria isolada na cultura .....	29
Tabela 6 – Relação, entre culturas positivas, negativas e bactéria isolada na cultura .....	30
Tabela 7 – Testando a homogeneidade da curva de sobrevivência .....	32

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Comparação entre os grupos de animais sobreviventes e óbitos antes de 12 horas após indução de peritonite .....	30
Gráfico 2 – Comparação entre os grupos de animais sobreviventes e óbitos entre 12 e 48 horas após a indução da peritonite .....	31
Gráfico 3 – Testando a homogeneidade da curva de sobrevivência .....	31
Gráfico 4 – Comparação da incidência de derrames pleurais nos grupos A e B.....	32

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito do bloqueio transdiafragmático na vigência de peritonite aguda infecciosa induzida por inoculação de suspensão bacteriana qualitativa e quantitativa predeterminada. Foram analisados 41 ratos, adultos, machos, da raça Wistar, com peso variando de 118 a 399 gramas. Os animais foram alocados em dois grupos: grupo A ou controle (n=19), e grupo B ou experimental (n=22). Os animais do grupo A, não submetidos a bloqueio transdiafragmático, foram mantidos sob condições ad libitum. O grupo B foi submetido a laparotomia e bloqueio da superfície peritoneal diafragmática com membrana celulósica e mantido sob as mesmas condições por 15 dias. Após esse período, em ambos os grupos inoculou-se, por via percutânea na cavidade abdominal, suspensão bacteriana constituída de *Pseudomonas aeruginosa* 2,7 x 10<sup>9</sup> UFC/ ml (ATCC 25853), na proporção de 1 ml de suspensão para cada 100 gramas de peso. Sempre que se detectou o óbito, o animal foi submetido a necrópsia para avaliação macroscópica da cavidade peritoneal e pleural, bem como coleta de conteúdo pleural e punção intracardíaca para cultura. Os animais sobreviventes de ambos os grupos foram sacrificados após 48 horas e, também, submetidos a necrópsia e coleta de material para avaliação bacteriológica. Verificou-se que todos os animais apresentaram sinais clínicos, apesar de subjetivos, compatíveis com estado séptico evolutivo. A incidência de derrame pleural observada no grupo controle em relação ao grupo experimental foi, respectivamente, 94,7% e 36,4% (p=0,0001). Na análise bacteriológica do derrame pleural e na hemocultura de ambos os grupos, isolou-se como agente único *Pseudomonas aeruginosa* em, respectivamente, 88,46% e 60,97%. Para a análise da curva de sobrevivência utilizou-se o método Não-paramétrico de Kaplan-Meier, e o resultado evidenciou maior sobrevida estatisticamente significativa no grupo B (p=0,024; p=0,0211). Demonstrou-se, no presente estudo, que os animais submetidos a bloqueio transdiafragmático prévio com membrana celulósica apresentaram maior sobrevida e menor frequência de derrame pleural, quando comparados aos animais não submetidos ao bloqueio.

## ABSTRACT

The goal of this study was to analyze the effect of transdiaphragmatic blockage due to acute infectious peritonitis, induced by inoculation of predetermined qualitative and quantitative bacterial suspension analysis. Forty-one adult, male, Wistar rats were studied. Their weight vary from 118 to 399 grams. The animals were allocated into two groups: group A or control group (n= 19), and group B or experimental group (n=22). The animals in group A, not submitted to transdiaphragmatic blockage, were kept under ad libitum conditions. The animals in group B were submitted to laparotomy and diaphragmatic blockage of the peritoneum surface with celluloid membrane and kept under the same conditions for fifteen days. After this period of time, both groups received a percutaneous inoculation of bacterial suspension in the peritoneal cavity, containing *Pseudomonas aeruginosa*  $2,7 \times 10^9$  UFC/ml (ATCC 25853). The dosage was 1 ml of the suspension for every 100 grams of weight. In every death, the animal was submitted to necropsy for peritoneal and pleural cavity macroscopic analysis, as well as pleural effusion and intracardiac blood collected for culture and bacterial analysis. The survivors animals of both groups were sacrificed after forty-eight hours and also submitted to necropsy and material collection for bacteriologic evaluation. It was verified that ali the animals had subjective clinical signs of sepsis in evolution. The incidence of pleural effusion observed in the control group and experimental group was, respectively, 94,7% and 36,4% ( $p=0,0001$ ). The bacterial analysis showed, in both groups, *Pseudomonas aeruginosa* as the unique agent found in pleural effusion and blood culture, respectively, 88,46% and 60,97%. To study the survival rate, the Kaplan-Meier method was used, and the result was a bigger survival rate in group B, statistically significant ( $p=0,024$ ;  $p=0,0211$ ). The present study demonstrated that the animals submitted to previous transdiaphragmatic blockage with celluloid membrane, had a bigger survival rate and less frequency of pleural effusion when compared with the animals not submitted to the blockage.

## 1 INTRODUÇÃO

A palavra peritônio provém do grego *peritónaiion* (de *perí* - em volta, *tónos* - estendido), ou seja, a membrana serosa que reveste as vísceras e cavidade abdominal. Embriologicamente deriva do mesoderma que recobre a cavidade celômica (BOUCHET et al., 1989).

Entende-se por peritonite a inflamação de um segmento ou de toda a superfície parietal e visceral da membrana peritoneal. Uma vez instalada a infecção, qualquer que seja sua causa, desencadeia-se uma série de respostas envolvendo a membrana peritoneal, o intestino e os compartimentos de líquidos orgânicos que, secundariamente, produzem respostas nos sistemas neuroendócrino, cardiovascular, renal, metabólico e imunológico (SHARBAUCH et al., 1971).

Classicamente as peritonites são divididas em primárias e secundárias, sendo estas subdivididas em peritonite supurativa aguda, crônica, química e granulomatosa (DAVIS et al., 1967; MAI NCOT, 1980).

A peritonite supurativa aguda constitui a forma mais comum de peritonite em seres humanos, resultando geralmente da rotura de uma víscera abdominal e, conseqüentemente da contaminação da cavidade peritoneal. A metade de todos os choques sépticos fatais são secundários a esse tipo de peritonite (DAVIS et al., 1967).

SHARBAUCH et al. (1971) destaca a grande freqüência clínica e os pobres resultados freqüentemente obtidos no tratamento da peritonite bacteriana aguda, enfatizando a necessidade de pesquisas nas áreas de fisiopatologia e de tratamento dessa condição mórbida. A limitação ética no manuseio em *anima nobili* incentiva o desenvolvimento e o controle de modelos experimentais passíveis de serem reproduzidos com facilidade e fidedignidade, além de pouco dispendiosos.

A literatura consigna vários modelos experimentais utilizados na indução de peritonite e septicemia: inoculação de material fecal fresco (ONDERDONK et al., 1974), cerclagem e punção do ceco (BAKER et al., 1983), ligadura cecal (CLOWES et al., 1976), implantação de cápsula gelatinosa contendo suspensão bacteriana (NICHOL5 et al., 1978; FREIRE et al., 1989; WAITZBERG et al., 1991), inoculação de suspensões bacterianas qualitativas e quantitativas conhecidas (CUILCEN, 1992), incisão transversal padronizada no ceco (CRECA et al., 1994).

Vários são os trabalhos que enfatizam o papel da membrana peritoneal diafragmática quando da presença de bactérias livres na cavidade abdominal (DUNN et al., 1985,1987; DUMONT et al., 1986; CRECA et al., 1994). Essa resposta baseia-se na absorção de bactérias através dos estomas linfáticos diafragmáticos, que ocorre, principalmente, pela existência de um gradiente de pressão entre o espaço subfrênico e a cavidade peritoneal (CELDRÁN et al., 1993).

O objetivo deste trabalho foi a indução de peritonite aguda com inoculação de qualitativo e quantitativo bacteriano conhecido em dois grupos de ratos. Em um dos grupos foi testado um modelo de bloqueio transdiafragmático com o uso de membrana celulósica semipermeável. Foram estudadas as alterações clínicas, as alterações macroscópicas da cavidade peritoneal, a presença de derrame pleural e sua análise bacteriológica. Realizou-se avaliação bacteriológica das hemoculturas e determinou-se o tempo de sobrevivência nesses grupos de animais.

## 2 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 de livros. Procurou-se separar os temas referentes à indução experimental de peritonite daqueles que dizem respeito à participação da membrana peritoneal diafragmática.

### 2.1 DA INDUÇÃO DE PERITONITE

CROOK et al. (1968) realizaram estudo experimental de peritonite em 94 cães, ligando-se o apêndice cecal, de forma a interromper o suprimento sanguíneo, para conseqüente necrose. A mortalidade no grupo de animais não tratados foi de 78%.

SHARBAUCH et al. (1971) apresentaram trabalho experimental em 34 cães, induzindo peritonite por meio de inoculação intraperitoneal de suspensão fecal estéril (preparada com fezes dos próprios cães) e suspensões bacterianas previamente padronizadas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella*, *Aerobacter*, *Enterococcus* e *Staphylococcus aureus*. O grupo controle recebeu apenas suspensão fecal estéril, sendo que apenas um animal apresentou letargia nas primeiras 24 horas e todos os cães sobreviveram. No grupo de cães em que se utilizou *Pseudomonas aeruginosa* associada à suspensão de fezes estéreis, observou-se 100% de óbito, sendo a média do tempo de sobrevivência inferior a 24 horas. O autor conclui que o método apresenta como vantagem o fato de ser similar às formas usuais de peritonite bacteriana, de permitir a investigação dos efeitos produzidos quer por uma única bactéria quer por diferentes espécies, evidenciar o sinergismo da ação bacteriana e fezes estéreis, além de poder ser útil para avaliação da eficácia dos diversos regimes terapêuticos.

ONDERDONK et al. (1974) desenvolveram um modelo induzindo peritonite em ratos Wistar, por meio de implantação de cápsula gelatinosa contendo suspensão de fezes retiradas do ceco e sulfato de bário estéril. Esse material era misturado em igual volume de caldo glucose-peptona fermentado e sulfato de bário a 10%, resfriados em nitrogênio líquido a - 40°C e estocados até serem usados.



Observaram que ocorre uma doença bifásica, sendo a primeira fase - 5 dias - caracterizada por peritonite generalizada associada a exsudato inflamatório e taxa de mortalidade de 43%. Os animais sobreviventes à fase aguda apresentaram discretos abscessos intrabdominais após o sétimo dia de pós-operatório.

BARTLETT et al. (1978) dando continuidade à linha de pesquisa descrita anteriormente por ONDERDONK et al. (1974), confirmaram a característica bifásica da infecção intra-abdominal: a primeira fase, relacionada à peritonite aguda por *Escherichia coli*; a segunda, à formação de abscessos causados por anaeróbios. Essa observação sugere que os microorganismos coliformes e anaeróbios são importantes patógenos na indução da peritonite, embora diferentes tipos de microorganismos influenciem na seqüência de eventos da fisiopatologia das infecções intra-abdominais.

BROWNE et al. (1976) descreveram um modelo de peritonite em camundongos machos HAM / ICR, utilizando concentração de bactérias previamente determinadas. Induziu-se peritonite por meio de injeção intra-abdominal de suspensão bacteriana mono ou polimicrobiana, contendo *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* e *Bacteroides fragilis*. A importância dos organismos anaeróbicos e, particularmente, *Bacteroides fragilis* é um fator contribuinte na alta incidência de mortalidade. O uso de culturas puras de bactérias e padronização na amostra de roedores oferece um modelo barato e tecnicamente reproduzível.

WICHTERMAN et al. (1980) realizaram estudo comparativo de modelos de peritonite em ratos Holtzman, por meio de ligadura cecal, ligadura cecal e punção simples do ceco e por dupla punção do ceco com agulhas padronizadas. Realizaram necrópsia em todos os animais de experimentação e estudo bacteriológico do fluido da cavidade abdominal. Foram isoladas várias bactérias da flora entérica: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus*, *Streptococcus viridans*, *Streptococcus bovis*, *Bacteroides fragilis*, *Clostridium sporogenes* e *Peptostreptococcus*. O grupo submetido à dupla punção de ceco apresentou 100% de mortalidade entre 16-24 horas. Concluíram que esse modelo padronizado permite o estudo das condições circulatórias hiper e hipodinâmicas, assim como o estudo da fisiopatologia das alterações produzidas no organismo e tecidos durante a septicemia.

BAKER et al. (1983) descreveram modelo experimental de peritonite, utilizando camundongos nos quais a infecção intra-abdominal foi induzida por meio

de ligadura do ceco e dupla punção do ceco com agulha padronizada. Os animais foram divididos em 7 grupos, e em 6 desses foram testadas várias modalidades terapêuticas: no grupo submetido à perfuração do ceco e lavagem peritoneal, a mortalidade foi de 20%, em 24 horas, e 60%, em 72 horas. Nos demais grupos foi instituída terapia com gentamicina isolada ou em combinação com metilprednisona ou tuftsin administrados após a ligadura. Houve aumento de sobrevivência estatisticamente significativa no grupo tratado com gentamicina e tuftsin e não foram observados benefícios no uso de corticosteróide. O grupo não tratado apresentou 100% de mortalidade, em 24 horas.

ANDERSSON et al. (1989) descreveram trabalho realizado com ratos Sprague-Dawley. A peritonite foi induzida por meio de injeção intra-abdominal de *Escherichia coli* associada a substâncias comumente contaminantes da cavidade abdominal uma doença bifásica, sendo a primeira fase – 5 dias – caracterizada por peritonite generalizada associada a exsudato inflamatório e taxa de mortalidade de 43%. Os animais sobreviventes à fase aguda apresentaram discretos abscessos intrabdominais após o sétimo dia de pós-operatório.

WAITZBERG et al. (1991) padronizaram um modelo de peritonite em ratos Wistar, com o intuito de estudar as alterações metabólicas frente a infecção de origem peritoneal. Prepararam cápsulas gelatinosas para ser implantadas na cavidade abdominal, as quais continham quantidades conhecidas e progressivas de *Escherichia coli*, sulfato de bário e fezes estéreis. A mortalidade dos animais até 48 horas pós implante da cápsula guardou relação direta com a concentração de *Escherichia coli* inoculada, chegando a 100% com concentrações de  $8,8 \times 10^7$ .

GUILGEN (1992), em dissertação de mestrado apresentada à UFPR, realizou estudo sobre peritonite em 150 ratos Wistar, nos quais a infecção foi induzida por meio de injeção intraperitoneal com suspensões bacterianas qualitativas e quantitativas conhecidas. Foram utilizadas suspensões crescentes de *Escherichia coli* e *Bacterioides fragilis*, injetadas em cinco grupos de animais. Observou que os grupos que receberam maiores concentrações de inóculo bacteriano ( $10^8$  e  $10^9$  UFC/ml) apresentaram perda de peso, alterações clínicas sugestivas de septicemia, peritonite aguda com exsudato peritoneal difuso, derrame pleural e óbito precoce.

FROIDEFOND et al. (1992) descreveram modelo de peritonite experimental em ratos, utilizando suspensão padronizada de *Pseudomonas aeruginosa* 108

UFC/ml e talco 125 mg. A suspensão foi injetada por via intraperitoneal e os animais foram randomizados em vários grupos de tratamento antimicrobiano. Esse estudo teve por finalidade avaliar a eficácia dos antibióticos (imipenem, ciprofloxacina, ceftazidina, amicacina), isolados ou em associação, no tratamento da peritonite induzida.

RIBAS FILHO (1994), em tese de doutorado apresentada à UFPR, realizou estudo visando analisar as alterações morfológicas dos órgãos das cavidades abdominal e pleural à luz da microscopia ótica e eletrônica. Utilizou modelo de peritonite experimental semelhante à descrita por GUILCEN (1992) e, sob anestesia inalatória com éter, os animais foram sacrificados por punção intracardíaca e posterior injeção fixadora com formolcálcio e solução de Karnovsky. Concluiu que as alterações histopatológicas encontradas no peritônio diafragmático variam de hiperplasias endoteliais (alterações discretas) a focos de exsudação neutrofílica com depósito de fibrina. Tais alterações predominam no período de 4 a 8 horas após indução de peritonite, sendo observada, à microscopia eletrônica, a presença de macrófagos após 2 horas, o que demonstra assim início precoce da resposta celular inflamatória.

## 2.2 DA ABSORÇÃO TRANSDIAFRAGMÁTICA

FOWLER (1900) observou que a mortalidade decrescia na vigência de peritonite aguda, quando os pacientes foram colocados semi-sentados no leito, presumivelmente em função da diminuição da absorção de toxinas pelos estomas diafragmáticos.

STEIMBERG (1944) observou STEIMBERG (1944) observou diminuição da mortalidade em animais de experimentação submetidos à indução de peritonite, quando mantidos com a cabeça e o tórax elevados.

LILL et al. (1979) realizaram estudo experimental *in vitro* com a intenção de analisar a capacidade de absorção da membrana peritoneal diafragmática. Utilizaram um modelo em ratos Sprague-Dawley, divididos em 2 grupos: grupo I (normal) e grupo II (operados). Neste grupo foi realizada escarificação da superfície peritoneal diafragmática com lixa fina (lixa d'água nº 600) e aplicação de talco. Os animais foram mantidos sob observação por 1 mês e, a seguir, sacrificados para

remoção da membrana peritoneal diafragmática. Na fase de experimentação, concluíram que a fibrose ocorrida no peritônio diafragmático reduz a capacidade de permeabilidade de grandes moléculas.

DUNN et al. (1985) realizaram estudo de peritonite experimental induzida por injeção intraperitoneal com suspensões crescentes de *Escherichia coli* viáveis e não viáveis, sendo essas radiomarcadas por iodo<sup>125</sup>. Descreveram 3 categorias de mecanismos de defesa do hospedeiro frente a infecção peritoneal: a primeira relaciona-se à absorção transdiafragmática por linfáticos; a segunda, a mecanismos celulares de fagocitose; a terceira, à formação de fibrina e abscesso entre as superfícies das alças intestinais. Concluíram que a absorção transdiafragmática em adição ao mecanismo de ação dos macrófagos e polimorfonucleares são a "primeira linha" de defesa do hospedeiro, na fase incipiente da infecção para eliminação das bactérias livres. O exsudato peritoneal é capaz de fagocitar, nas primeiras horas de infecção, 30% das bactérias inoculadas.

DUNN et al. (1987) apresentaram estudo com o propósito de analisar o *clearance* de absorção linfática transdiafragmática e ação fagocitária dos macrófagos (MCS) e polimorfonucleares (PMNS) em modelo experimental de peritonite. Foram utilizados ratos Sprague-Dawley e a indução de peritonite foi realizada por injeção intra-abdominal contendo suspensões crescentes de *Escherichia coli* não viáveis, marcadas com iodo radioativo. Concluíram que o início da absorção de bactérias (*clearance*) e a fagocitose eram extremamente rápidos, e poucas (< 3%) bactérias livres estavam presentes após duas horas. Assim, os macrófagos e a absorção transdiafragmática representam a "primeira linha" peritoneal de defesa do hospedeiro.

MINAO (1992), em dissertação de mestrado apresentada à Universidade Federal do Paraná, descreveu estudos experimentais em cães, com o objetivo de demonstrar a absorção linfática da cavidade peritoneal. Utilizando solução de sulfato de bário injetada na cavidade peritoneal, verificou que o contraste era absorvido pelos linfáticos diafragmáticos e passava posteriormente ao dueto linfático do tórax no período inicial de 12 horas.

GRECA et al. (1994) apresentaram modelo de peritonite em 100 ratos Wistar, com o intuito de analisar a influência do bloqueio da superfície peritoneal diafragmática e a mortalidade nos diversos grupos de animais. Como meio de bloqueio da absorção, utilizaram dois métodos: escarificação da superfície peritoneal

diafragmática com gaze seguida de pulverização de talco, e aplicação de cola cirúrgica (colagel). Verificaram que o primeiro método, quando realizado 15 dias antes da indução da peritonite, diminuiu significativamente a mortalidade dos animais. Entretanto, o grupo submetido a bloqueio diafragmático prévio com cola cirúrgica, ou submetido a bloqueio diafragmático na vigência da indução de peritonite, não influenciou o aumento da sobrevivência dos animais.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná, com o apoio do Laboratório de Análises Clínicas Santa Brígida e do Biotério da Universidade Federal do Paraná.

#### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados 41 ratos Wistar, adultos, machos, provenientes do Biotério da Universidade Federal do Paraná, com peso variando de 118 a 399 gramas, divididos em 2 grupos: grupo A ou controle (n= 19) e grupo B ou experimental (n= 22).

Ambos os grupos foram submetidos à indução de peritonite por injeção intraperitoneal de suspensão bacteriana qualitativa e quantitativa previamente determinada.

O grupo B foi submetido ao bloqueio prévio da superfície peritoneal diafragmática com membrana celulósica - BIOFILL (Produtos Biotecnológicos S.A.).

Os animais que não desenvolveram choque séptico e conseqüente óbito foram sacrificados após 48 horas do início do experimento.

#### 3.2 TÉCNICA DO BLOQUEIO DIAFRAGMÁTICO COM COLOCAÇÃO DA MEMBRANA CELULÓSICA

Os animais do grupo B, após indução anestésica com éter-sulfúrico, foram colocados, em posição supina, sobre um suporte de madeira recoberto por cortiça; os membros anteriores e posteriores foram presos às quatro extremidades do suporte, com o auxílio de alças elásticas. Manteve-se o plano anestésico pela inalação de éter-sulfúrico. Procedeu-se à tricotomia, abrangendo as regiões de hipocôndrio direito, esquerdo e região epigástrica. Para a antisepsia, utilizou-se solução de PVPI tintura (polivinilpirrolidona-iodo 10%). Realizou-se celiotomia por incisão ogiva I com concavidade inferior (tipo incisão de Chevron). Utilizou-se

técnica asséptica. Seccionou-se o ligamento falciforme do fígado e expôs-se a superfície peritoneal diafragmática (FIGURA 1). A membrana celulósica estéril, previamente preparada, foi colocada com o auxílio de pinças atraumáticas delicadas, recobrendo toda a superfície diafragmática abdominal (FIGURA 2).

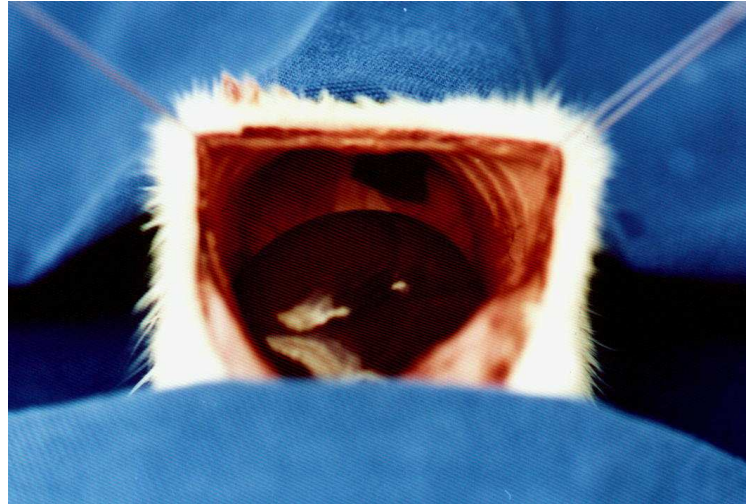


Figura 1 – Exposição da superfície peritoneal diafragmática após secção do ligamento falciforme do fígado

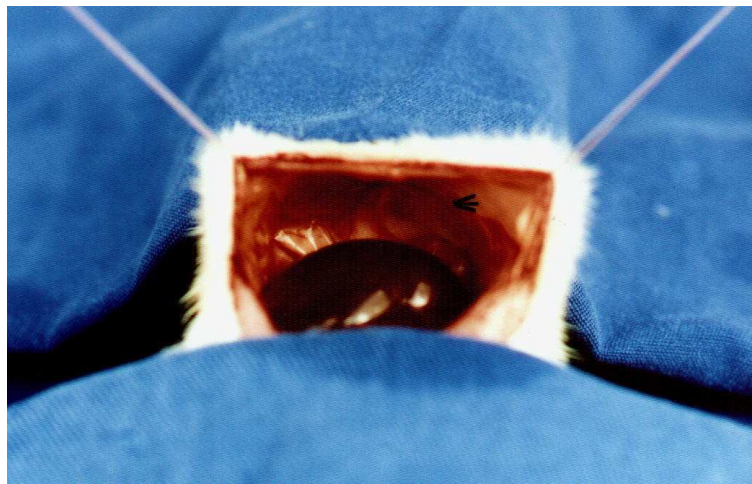


Figura 2 – Exposição da superfície peritoneal diafragmática após colocação da membrana celulósica - Biofill. (→)

Reconstituiu-se a parede abdominal por meio de sutura tipo chuleio contínuo, interessando peritônio parietal e plano muscular com fio de polipropileno 4-0. A seguir, utilizou-se a mesma sutura e fio para a pele. Administrou-se meperidina na dose de 20 mg/kg, via subcutânea para analgesia pós-operatória. Os animais

foram mantidos sob observação diária por um período de 15 dias. Esse período foi suficiente para promover aderência total entre a superfície do fígado e a superfície peritoneal diafragmática, conforme constatado em ensaios preliminares.

### 3.3 PREPARO DA SUSPENSÃO BACTERIANA

Utilizou-se cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853 - Difco), obtida de amostras liofilizadas do *American Type Culture Collection*, Atlanta - USA. As amostras foram suspensas em caldo *Tryptic Soya Broth* (TSB - Difco) para reativação das cepas. As suspensões de *Pseudomonas aeruginosa* foram subcultivadas em placas de Cistina Lactose Eletrólito Deficiente (CLED - Difco) e incubadas aerobicamente a 37°C por 18 horas.

Após a incubação, a cepa foi subcultivada em caldo TSB e incubada novamente nas atmosferas indicadas, por 18 horas. As suspensões bacterianas foram adequadas à concentração de 10<sup>9</sup> bactéria/ml, utilizando-se o padrão nº 9 da escala de MacFarland (Turbidimetria), e medidas fotometricamente. Os inóculos eram diluídos em caldo TSB até que a turbidez correspondesse fotometricamente à turbidez do padrão nº 9 da referida escala.

Acertada a turbidez e, conseqüentemente, a concentração desejada, a suspensão bacteriana era inoculada, em um período máximo de 30 minutos, em cada grupo de animais.

A suspensão bacteriana continha 2,7 x 10<sup>9</sup> UFC/ml de *Pseudomonas aeruginosa*.

### 3.4 TÉCNICA DE INOCULAÇÃO DA SUSPENSÃO BACTERIANA

Os ratos foram submetidos à anestesia inalatória com éter-sulfúrico e, posteriormente, utilizou-se solução de PVPI tintura para antisepsia do quadrante abdominal caudal esquerdo. A inoculação foi realizada por punção percutânea intraperitoneal, com seringas de 3,0 e de 1,0 ml e agulhas 25x7 mm estéreis.

A quantidade injetada foi de 1 ml de suspensão bacteriana para cada 100 gramas de peso dos ratos.



### 3.5 IDENTIFICAÇÃO E CONTROLE DOS ANIMAIS

Os animais foram alojados em caixas plásticas apropriadas e marcados com ácido pícrico para que pudessem ser devidamente individualizados e acompanhados. Para tal, foram marcados da seguinte forma: o primeiro rato, na cabeça; o segundo, no dorso; o terceiro, na pata traseira; o quarto, na pata dianteira; o quinto rato não foi marcado.

Durante o período de experimentação, os animais receberam ração e água *ad libitum*, assim como avaliações clínicas repetidas.

### 3.6 OBSERVAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS NO PERÍODO PÓS-INDUÇÃO DE PERITONITE

No período pós-indução de peritonite, os animais foram observados por meio de avaliação clínica subjetiva. As alterações observadas e características do estado séptico evolutivo dos animais foram: piloereção, taquipnéia, diminuição da atividade física, redução da ingestão de água e ração, secreção conjuntival de coloração escura.

### 3.7 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Para análise dos animais nos quais se detectou o óbito, foi realizada necropsia. Os animais que não apresentaram óbito foram sacrificados com 48 horas após a inoculação da suspensão bacteriana. O sacrifício foi realizado por inalação de éter sulfúrico, e os animais foram submetidos a toracotomia e laparotomia, com técnica asséptica, para análise e coleta de material.

### 3.8 OBSERVAÇÃO MACROSCÓPICA

Os animais foram submetidos primeiramente a toracotomia transversa bilateral para fins de investigação da cavidade pleural. Considerou-se como derrame pleural a presença de líquido seroso ou sero-sanguinolento na cavidade pleural. Para investigação da cavidade peritoneal foi realizada laparotomia mediana ampla e inspeção detalhada das vísceras abdominais, superfície peritoneal abdominal e diafragmática, eficiência do bloqueio diafragmático com a membrana celulósica, presença de abscessos e aderências. Considerou-se como peritonite difusa a presença de exsudato seroso peritoneal associado à presença de fibrina e odor fétido. Em tais procedimentos, utilizou-se técnica asséptica.

### 3.9 COLETA DE MATERIAL

Nos casos em que o derrame pleural estava presente, procedeu-se à coleta do material com o auxílio de seringa de 3,0 ml e agulha 25 x 7 mm estéreis, o qual imediatamente era injetado em caldo T5B para transporte. A seguir, em todos os animais, procedeu-se à punção intracardíaca com seringa e agulha estéreis semelhantes às anteriores (FIGURA 3). A amostra sanguínea coletada, aproximadamente 1,0 ml, era injetada em meio de transporte TSB e encaminhada para cultura com a intenção de recuperação da bactéria previamente inoculada.

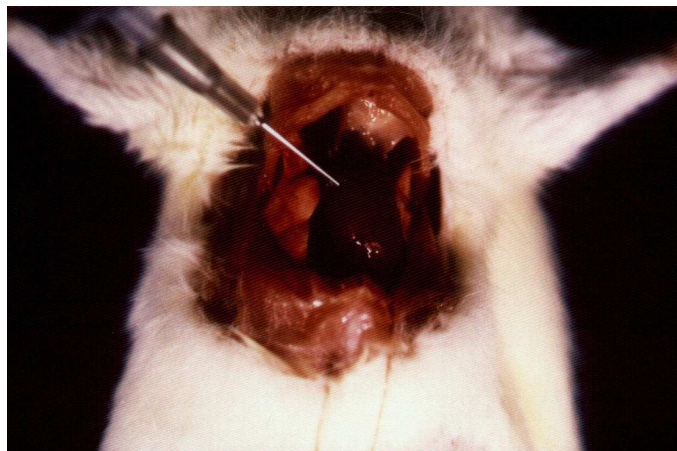


Figura 3 – Realização de punção intracardíaca a céu aberto

### 3.10 METODOLOGIA ESTATÍSTICA

Com o intuito de uma avaliação objetiva dos dados obtidos, empregou-se análise estatística adequada para a amostra, que consistiu no emprego de dois métodos: Teste Qui-quadrado de Pearson e Teste Não-paramétrico de Kaplan-Meier.

Os resultados programados para análise foram: distribuição da mortalidade em relação à frequência, mortalidade em relação à frequência e ao tempo de experimento e à frequência de derrame pleural em ambos os grupos.

Definiu-se como nível de significância estatística  $p < 0,05$  e assinalou-se com asterisco os valores significativos.

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-6023/89) e as normas para apresentação de trabalhos da Universidade Federal do Paraná (1994). O trabalho foi conduzido respeitando-se a legislação brasileira - Lei Federal nº 6.638 (1979), Código de Nuremberg e a Declaração de Helsinque.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA NO PERÍODO PÓS-INDUÇÃO DE PERITONITE

No período pós-indução de peritonite, os animais foram avaliados por meio de observação clínica subjetiva. As alterações observadas e características do estado séptico evolutivo foram: pêlos híspidos, taquipnéia, diminuição da atividade física, redução da ingestão de água e ração e secreção conjuntival de coloração escura.

Não houve diferenças na observação clínica nos dois grupos de animais.

### 4.2 AVALIAÇÃO DA MORTALIDADE

No grupo A, 13 animais (68,42%) foram a óbito: 8 morreram antes de 12 horas e 5 entre 12 e 48 horas após a inoculação da suspensão bacteriana. No grupo B, 8 animais (36,36%) apresentaram óbito: 4 morreram antes de 12 horas e 4 entre 12 e 48 horas. Os animais que não foram a óbito foram sacrificados 48 horas após a inoculação. As tabelas 1 e 2 resumem esses resultados.

TABELA 1 – INCIDÊNCIA DE SOBREVIVENTES E ÓBITOS NOS GRUPOS DE ANIMAIS ANTES DE 12 HORAS

	GRUPOS		
	A (Controle)	B (Experimental)	
Óbitos	8	4	12
Vivos	11	18	29
TOTAL	19	22	41

TABELA 2 – INCIDÊNCIA DE SOBREVIVENTES E ÓBITOS NOS GRUPOS DE ANIMAIS ANTES DE 12/48 HORAS

	GRUPOS		
	A (Controle)	B (Experimental)	
Óbitos	5	4	9
Vivos	6	14	20
TOTAL	11	18	29

#### 4.3 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA CAVIDADE PLEURAL

Observou-se macroscopicamente a cavidade pleural em relação à presença de derrame pleural em ambos os grupos. No grupo A, foram observados 17 derrames pleurais bilateralmente e 1 unilateral à esquerda. No grupo B, observou-se 8 derrames pleurais bilaterais. Os resultados são apresentados na tabela 3.

TABELA 3 – INCIDÊNCIA DE DERRAME PLEURAL NOS GRUPOS DE ANIMAIS

	GRUPOS		
	A (Controle)	B (Experimental)	
Óbitos	18#	8	26
Vivos	1	14	15
TOTAL	19	22	41

(#) Um caso de derrame pleural unilateral à esquerda

#### 4.4 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA DA CAVIDADE ABDOMINAL

Em todos os animais que foram a óbito, constatou-se peritonite difusa. Em 4 animais do grupo A observou-se a presença de aderências de epíplon com alças intestinais; no grupo B, 6 animais apresentaram resultado semelhante, porém com aderências também na superfície do fígado (FIGURA 4).

Entre os animais sobreviventes não se constatou presença de peritonite difusa.



Figura 4 – Presença de aderência da superfície hepática e epíplon ao peritônio diafragmático. (→)

No grupo B, em 10 animais (45,45%), observou-se a presença de granuloma entre a superfície peritoneal diafragmática e a superfície hepática (FIGURAS 5 e 6).

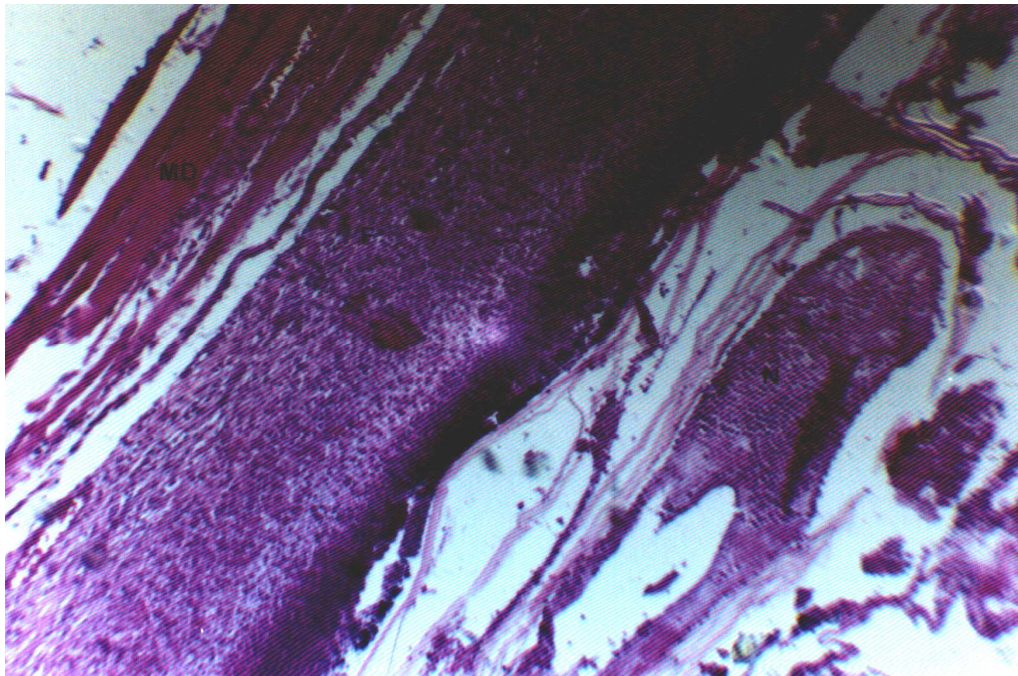


Figura 5 – Microfotografia representada por músculo diafragmático (MD) tendo aderido cápsula de granuloma representada por fibrose (F), tecido de granulação (TG) e necrose celular (N). (H.E. x 40)



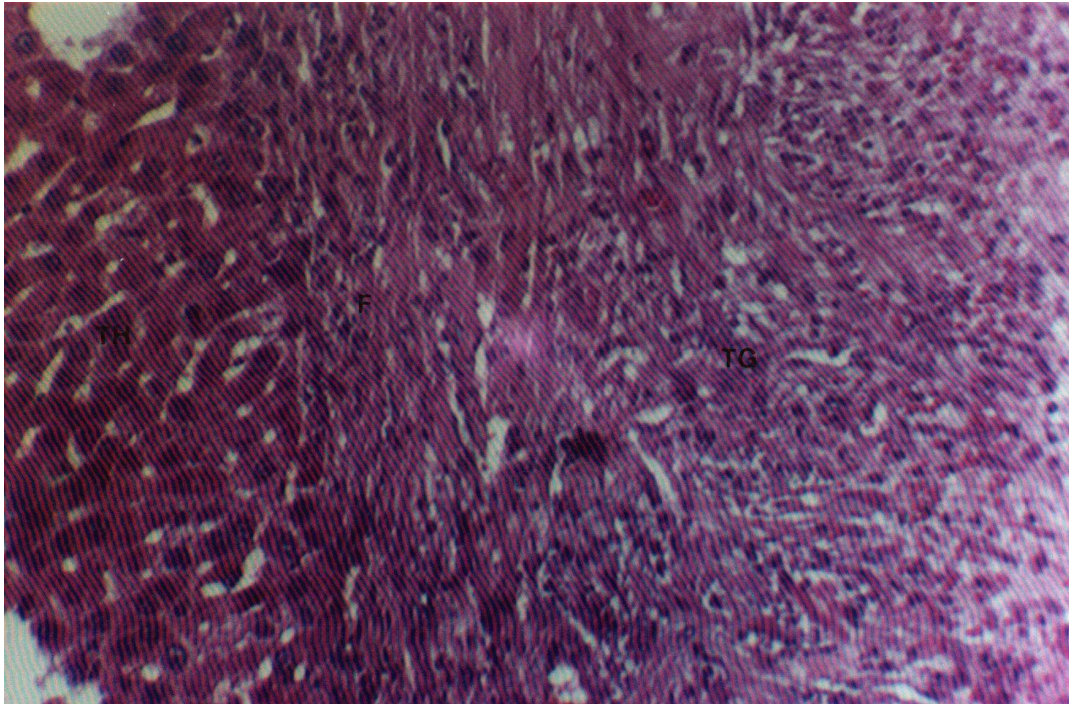


Figura 6 – Microfotografia representada por tecido hepático (TH) tendo aderido fibrose (F) e tecido de granulação (TG). (H.E. x 100)

Não se constatou presença de abscesso entre alças intestinais ou em recessos peritoneais em ambos os grupos de animais.

Os resultados são apresentados nas tabelas 4 e 5.

**TABELA 4 – RELAÇÃO, ENTRE ANIMAIS QUE FORAM A ÓBITO, DA PRESENÇA DE PERITONITE DIFUSA, DE ABSCESSO INTRAPERITONEAL, DE ADERÊNCIAS PERITONEAIS E DE DERRAME PLEURAL**

Grupo Animal	Nº de Animais	Peritonite	Abscessos	Aderências	Derrame Pleural
A	13	13	0	4	13
B	8	8	0	6	

**TABELA 5 – RELAÇÃO, ENTRE OS ANIMAIS SOBREVIVENTES, DA PRESENÇA DE PERITONITE DIFUSA, DE ABSCESSO INTRAPERITONEAL, DE ADERÊNCIAS PERITONEAIS E DE DERRAME PLEURAL**

Grupo Animal	Nº de Animais	Peritonite	Abscessos	Aderências	Derrame Pleural
A	6	0	0	0	5
B	14	0	0	4	1

#### 4.5 ESTUDO BACTERIOLÓGICO DO DERRAME PLEURAL

Observou-se um total de 26 derrames pleurais, sendo 18 (69,23%) no grupo A e 8 (30,76%) no grupo B.

Houve crescimento de colônias em todos os casos, sendo em 23 animais (88,46%) *Pseudomonas aeruginosa*, 2 animais (7,69%) *Pseudomonas aeruginosa* + *Staphylococcus sp.* e em 1 animal (3,84%) *Escherichia coli*. Esses resultados são apresentados na tabela 6.

TABELA 6 – RELAÇÃO, ENTRE OS GRUPOS DE ANIMAIS, NÚMERO DE DERRAMES PLEURAIIS E BACTÉRIA ISOLADA NA CULTURA

Grupo	Nº Derrame Pleural	%	Bactéria Isolada		
			P.	P.+S.	E. coli
A	18	69,23	15	2	1
B	8	30,76	8	-	-
TOTAL	26	100	23 (88,46%)	2 (7,69%)	1 (3,84)

Nota:

P. = *Pseudomonas aeruginosa*

P.+ S. = *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus sp.*

E. coli = *Escherichia coli*

- = bactéria não-isolada

#### 4.6 ESTUDO BACTERIOLÓGICO DAS PUNÇÕES INTRACARDÍACAS

Realizou-se punção intracardíaca nos animais de ambos os grupos. Em 29 casos houve crescimento de colônias e em 12 casos as culturas foram negativas.

Nos casos em que houve crescimento de colônias, as bactérias isoladas na cultura foram: *Pseudomonas aeruginosa*, 25 casos (86,20%); *Pseudomonas aeruginosa* + *Staphylococcus sp.*, 1 caso (3,44%); *Escherichia coli*, 1 caso (3,44%); *Proteus morgani*, 2 casos (6,89%). Esses resultados estão apresentados na tabela 7.



TABELA 7 – RELAÇÃO, ENTRE CULTURAS POSITIVAS, NEGATIVAS E BACTÉRIA ISOLADA NA CULTURA

Grupo	Cultura Positiva	Cultura Negativa	Bactéria Isolada			
			P.	P.+E.	E. coli	Prot.
A	16	3	14	1	1	-
B	13	9	11	-	-	2
TOTAL	29 (70,73%)	12 (29,26%)	25 (86,20%)	1 (3,44%)	1 (3,44%)	2 (6,89%)

P. = *Pseudomonas aeruginosa*

Prot. = *morganii*

P.+ S. = *Pseudomonas aeruginosa, staphylococcus sp.* - = bactéria não-isola

E. coli = *Escherichia coli*

#### 4.7 COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS DOS GRUPOS DE ANIMAIS

Para inferência estatística da diferença de óbitos e sobreviventes entre os grupos de animais foi aplicado o Teste Qui-quadrado de Pearson. Os resultados foram analisados levando-se em consideração o óbito ocorrido antes de 12 horas e entre 12 e 48 horas, após a indução de peritonite. Esses resultados são demonstrados nos gráficos 1 e 2.

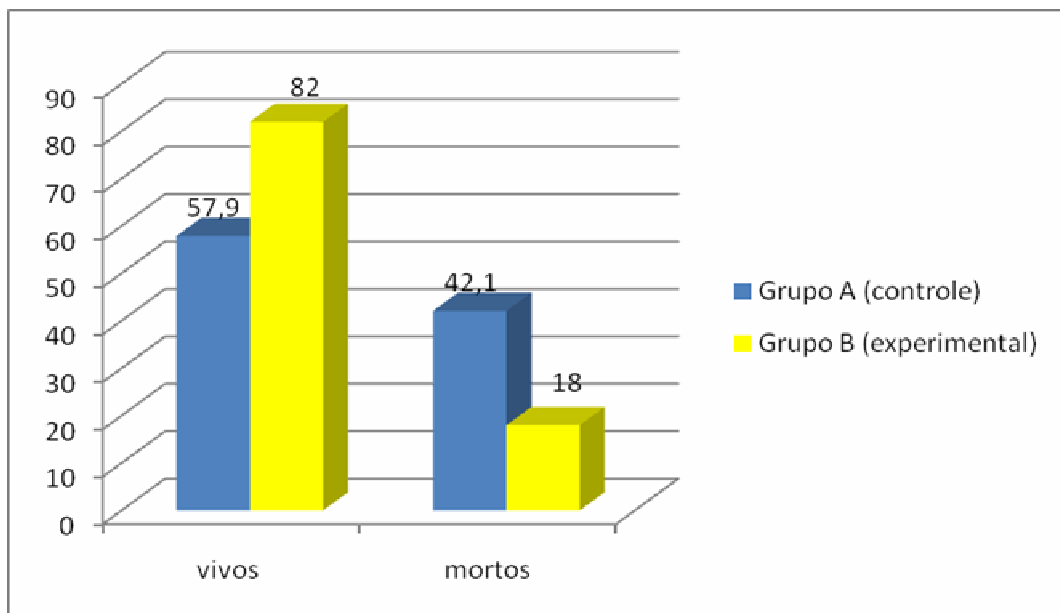


Gráfico 1 – Comparação entre os grupos de animais sobreviventes e óbitos antes de 72 horas após indução de peritonite

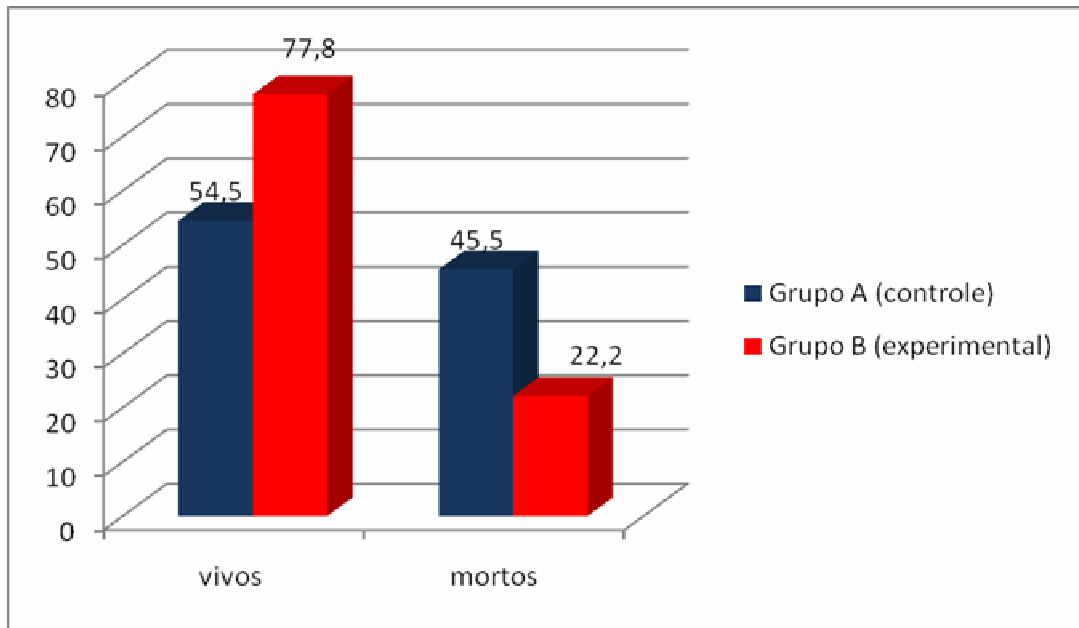


Gráfico 2 – Comparação entre os grupos de animais sobreviventes e óbitos entre 72 e 48 horas após a indução da peritonite

Realizou-se análise estatística em relação à frequência de óbitos e tempo de sobrevivência dos animais por meio do Método Não-paramétrica de Kaplan-Meier. Pelos resultados obtidos por esta análise, pode-se concluir que há evidências estatisticamente significativas de que os animais do grupo B sobreviveram mais tempo do que os animais do grupo A, valor de  $p = 0,0264^*$  e  $p = 0,0211^*$ . Esses resultados são apresentados no gráfico 3 e na tabela 7.

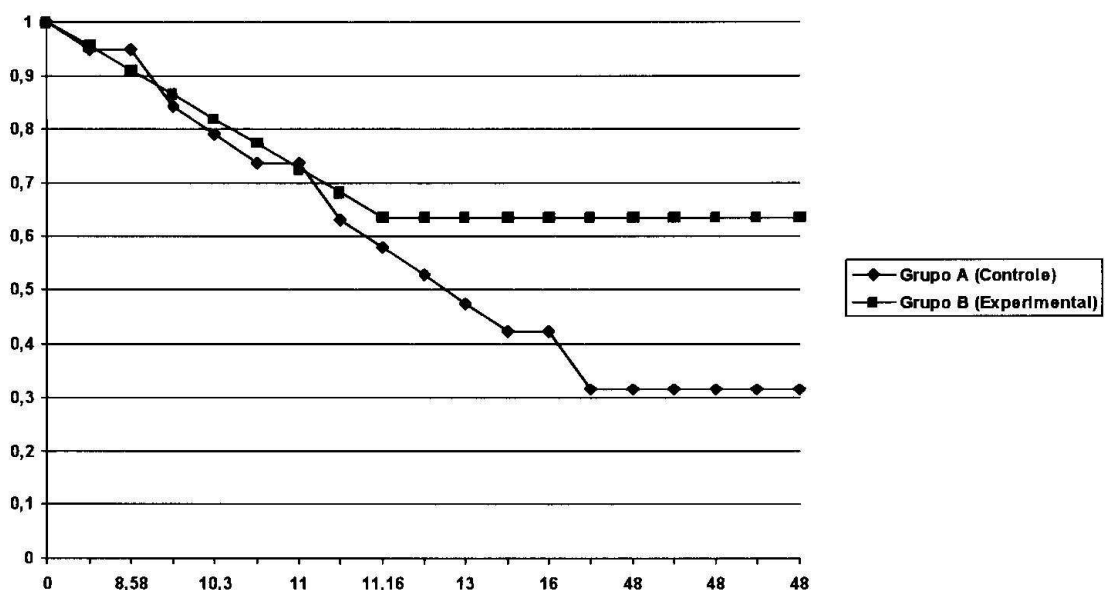


Gráfico 3 – Testando a homogeneidade da curva de sobrevivência

TABELA 8 – TESTANDO A HOMOGENEIDADE DA CURVA DE SOBREVIVÊNCIA

Teste	Qui-Quadrado	DF	Pr > Qui-Quadrado
Long-Rank	4.9278	1	0.0264*
Wilcoxon	5.3193	1	0.0211*

Na avaliação estatística dos resultados de derrames pleurais nos grupos de animais, utilizou-se o Teste Qui-quadrado de Pearson, por meio do qual se pode considerar que a proporção de derrames pleurais no grupo A foi estatisticamente maior do que no grupo B, com valor de  $p = 0,0001^*$ . Esses resultados são apresentados no gráfico 4.

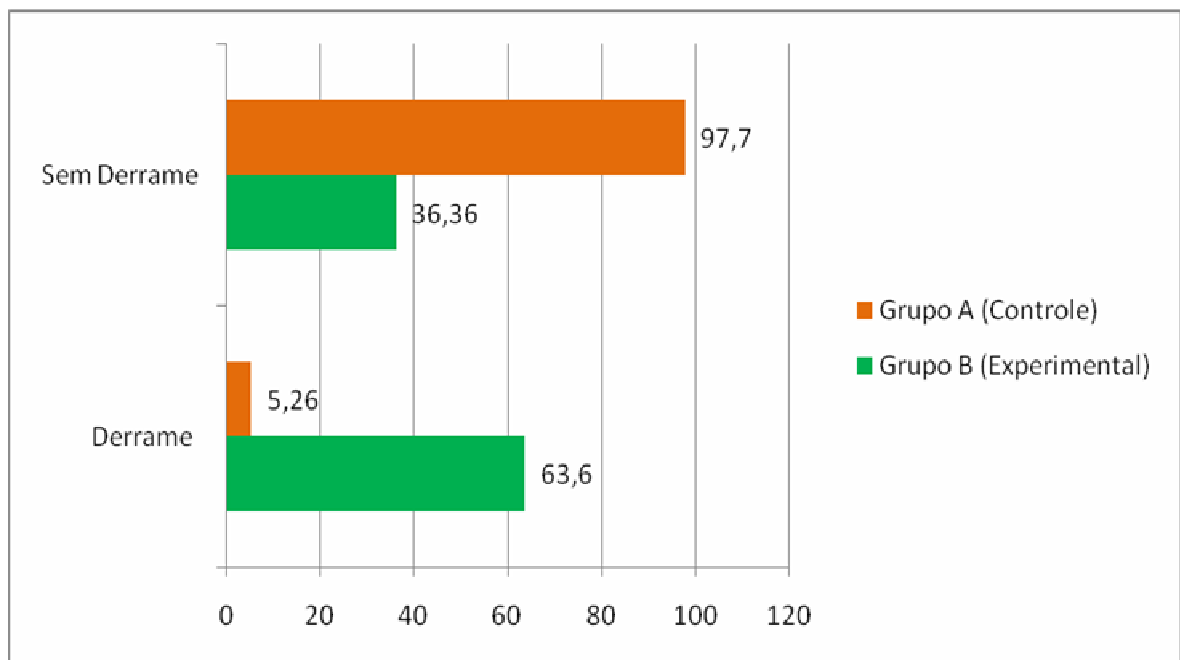


Gráfico 4 – Comparação da incidência de derrames pleurais nos grupos A e B

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 ESCOLHA DO ANIMAL

A escolha do modelo de animal, ratos Wistar, foi baseada em estudos prévios desenvolvidos como linha de pesquisa no Curso de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná (GUILGEN, 1992; RIBAS FILHO, 1994). Tais trabalhos demonstraram a possibilidade de se testar um modelo de peritonite em ratos dessa espécie, o qual permitiu comparação de grupos de animais e conseqüente estudo estatístico. Outra vantagem na escolha desses animais foi o baixo custo, pois basta um pequeno espaço físico para seu alojamento, os cuidados para controle e manutenção são mínimos, além de serem de fácil obtenção em nosso meio.

KELLY (1984); BURNET et al. (1957) utilizaram porcos-da-índia para estudo da peritonite experimental, admitindo serem de fácil manuseio e mais suscetíveis a infecção bacteriana que os ratos.

CROOK et al. (1968); SHARBAUGH et al. (1971) utilizaram o cão como modelo experimental. Alegam ser este mais adequado para o estudo das peritonites, por possuir cavidade abdominal maior que os outros animais de experimentação.

Em nosso meio é incontestável a dificuldade em se obter tais animais, além da necessidade de grandes áreas em biotérios para adequado controle e manutenção dos mesmos.

### 5.2 INÓCULO BACTERIANO

As cepas bacterianas foram obtidas de amostras liofilizadas do *American Type Culture Collection* (Atlanta, USA). Sendo assim, obteve-se uma efetiva padronização da suspensão bacteriana.

A escolha de cepas de bactérias gram negativas – *Pseudomonas aeruginosa* deve-se ao fato de que esta apresenta alta virulência e grande associação com choque endotóxico. A endotoxina, isolada por BOVIN (1941), é um

complexo de lipoproteína-carboidrato encontrada na parede celular de todas as bactérias gram negativas (WICHTERMAN et al., 1980).

BORDEN et al. (1951) e BRAUDE et al. (1953) foram uns dos primeiros pesquisadores a citar o choque endotóxico causado por bactérias gram-negativas em seres humanos submetidos a transfusão sanguínea.

MAI NGOT (1980) classificou a *Pseudomonas aeruginosa* como sexta causa de peritonite em seres humanos.

KAZMI et al. (1992) realizaram estudos em pacientes renais crônicos que desenvolveram peritonite bacteriana por *Pseudomonas aeruginosa* sob regime de diálise peritoneal ambulatorial. Relataram que em aproximadamente 17% dos casos houve necessidade de remoção do cateter para sucesso na erradicação da infecção e 22% dos pacientes desenvolveram um novo quadro de peritonite por *Pseudomonas aeruginosa* após alguns meses.

### 5.3 DILUIÇÃO DO INÓCULO BACTERIANO

Para preparação do inóculo bacteriano, foram selecionadas bactérias com linhagem conhecida (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 - Difco). Com isso há possibilidade de reprodução e padronização desse inóculo.

Por meio de turbidimetria e fotometria adequou-se a concentração das suspensões bacterianas a  $10^9$ , composta por  $2,7 \times 10^9$  UFC/ml de *Pseudomonas aeruginosa*. Essas suspensões produziram um crescimento máximo de bactérias em incubação por 18 horas em *Tryptic soya broth*.

### 5.4 DA INOCULAÇÃO

A escolha do método para inoculação da suspensão bacteriana para indução de peritonite foi por meio de punção percutânea da cavidade abdominal. Esse método é seguro e de fácil execução.

CUILGEN (1992), utilizando a mesma metodologia, não obteve perfuração de alças intestinais ou indução de peritonite em grupo controle injetado com solução salina. Esse estudo, corroborado com outros dados da literatura, demonstra ser um

método seguro de indução de peritonite (BROWNE et al., 1976; DUNN et al., 1985; ANDERSSON et al., 1990; FROIDEFOND et al., 1992; RIBAS FILHO, 1994).

Outro método padronizado, utilizado para indução de peritonite em animais de experimentação, consiste na implantação de cápsulas gelatinosas na cavidade abdominal, as quais contêm bactérias e outros elementos. Em nosso meio, apresenta como desvantagem o manuseio elaborado para preparação das cápsulas e a necessidade de laparotomia para implantação na cavidade peritoneal (ONDERDONK et al., 1974; BARTLETI et al., 1976; FREIRE et al., 1989; WAITZBERG et al., 1991).

## 5.5 DOS GRUPOS DE ANIMAIS

Utilizaram-se 41 ratos Wistar, que foram divididos em dois grupos: grupo A ou controle e grupo B ou experimental.

Em ambos os grupos foi induzida peritonite por injeção intra-abdominal contendo suspensão bacteriana em concentração previamente padronizada de *Pseudomonas aeruginosa* 109 UFC/ml. O grupo B foi previamente submetido a bloqueio da superfície peritoneal diafragmática por meio da membrana celulósica. Nesse grupo foi respeitado o tempo de 15 dias entre o bloqueio diafragmático e a indução de peritonite. Conforme estudo piloto, esse período foi suficiente para que ocorresse o bloqueio do peritônio diafragmático.

## 5.6 DA OBSERVAÇÃO CLÍNICA

A observação clínica dos animais é um método de avaliação subjetiva do quadro séptico. Após 3 horas da indução da peritonite todos os animais apresentaram sinais clínicos do estado séptico evolutivo, o qual gradativamente regrediu nos animais sobreviventes até o término do experimento com 48 horas. Não houve diferença na observação clínica subjetiva nos grupos de animais. Os dados encontrados – piloereção, taquipnéia, diminuição da atividade física, redução da ingestão de água e ração, secreção conjuntival -, apesar de subjetivos, denotam a

morbidade da infecção nos animais submetidos a peritonite. Tais dados são corroborados pelos trabalhos de CUILCEN (1992) e RIBAS FILHO (1994).

## 5.7 DA MORTALIDADE

Verificou-se que a mortalidade foi de 68,42% e 36,36%, respectivamente, nos grupos A e B. Para análise estatística, quando se utilizou somente a frequência de óbitos nos períodos estipulados, não houve forte evidência de que os animais submetidos a bloqueio diafragmático prévio tivessem maior probabilidade de sobrevivência do que os animais que não sofreram bloqueio. Sendo assim, não houve significância estatística na análise desses resultados.

Em função das informações referentes ao tempo de sobrevivência dos animais, foi realizado teste estatístico para análise da curva de sobrevivência nos grupos.

A partir dos dados obtidos por essa análise, pode-se concluir que há evidências estatísticas significativas de que os animais que sofreram bloqueio diafragmático sobreviveram mais tempo comparados aos que não foram submetidos a bloqueio diafragmático. Esses resultados são corroborados pelos dados publicados por CRECA et al. (1994).

## 5.8 OBSERVAÇÃO DA CAVIDADE ABDOMINAL

Nos animais que foram a óbito, observou-se peritonite aguda difusa, sem formação de abscessos intraperitoneais. Na tabela 4 verifica-se que, no grupo A, em 4 animais foi observada a presença de aderências entre epíplon e alças intestinais; no grupo B, 6 animais apresentaram resultado semelhante, porém com aderências também na superfície do fígado.

Entre os animais sobreviventes não se constatou presença de peritonite.

Em todos os animais do grupo B, constatou-se a presença de aderência total entre a superfície do fígado e a superfície peritoneal diafragmática. Nesse grupo, em 10 animais (45,45%), observou-se presença de granuloma na região subfrênica.

SIMÕES et al. (1990), em trabalho experimental com cães, utilizando membrana celulósica como agente hemostático em lesões de fígado, baço e intestino delgado, constataram a intensa formação de aderências entre as vísceras abdominais e granulomas tipo corpo estranho.

## 5.9 DERRAME PLEURAL

Verificou-se no presente estudo que há maior frequência estatisticamente significativa de derrame pleural no grupo A em comparação com o grupo B.

Analisando os dados da tabela 4 e 4.1, verifica-se maior incidência de derrame pleural no grupo A, tanto nos animais que foram a óbito como nos sobreviventes, quando comparado ao grupo B. Esse dado sugere que o bloqueio diafragmático foi capaz de diminuir efetivamente a absorção bacteriana transdiafragmática, assim como diminuir a mortalidade precoce no grupo B.

CELDRÁN et al. (1991 e 1993) verificaram que na vigência de uma importante proliferação microbiana na cavidade peritoneal, a absorção pelos estomas diafragmáticos se converte na principal via de disseminação de bactérias e endotoxinas capazes de desencadear falência de múltiplos órgãos e, conseqüentemente, morte por peritonite. Além desse fato, deve-se levar em consideração que, na vigência de um quadro de peritonite há aumento da capacidade de drenagem da cavidade peritoneal pelos linfáticos diafragmáticos, e conseqüente diminuição da ação do eficaz filtro do sistema mononuclear fagocitário hepático.

A presença de derrame pleural na vigência de peritonite aguda também foi descrita nos trabalhos experimentais de SAAD (1983) e GUILGEN (1992).

ARAÚJO Jr. (1987), descreveu a presença de derrame pleural como um importante indicador da gravidade desse processo infeccioso.

No presente estudo houve nítida associação entre o desenvolvimento de derrame pleural e óbito precoce nos animais de ambos os grupos.

Em estudo piloto preliminar não foi verificada a presença de derrame pleural em animais submetidos exclusivamente ao bloqueio da superfície peritoneal diafragmática com membrana celulósica.



## 5.10 DO ESTUDO BACTERIOLÓGICO

Em todos os animais nos quais se constatou derrame pleural, foram realizadas coleta e análise bacteriológica para fins de resgate da bactéria previamente inoculada. Verificou-se um total de 26 derrames pleurais, detectando-se crescimento de germes em 100% dos casos. Desse total, em 88,46% houve crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*; em 7,69% de *Pseudomonas aeruginosa* + *Staphylococcus sp* e, em 3,84%, crescimento exclusivamente de *Escherichia coli*.

Punção intracárdica e hemocultura foram realizadas em todos os animais.

Verificou-se que em 70,73% houve crescimento de colônias. Desse total, em 86,20% a bactéria isolada foi *Pseudomonas aeruginosa*; em 3,44%, *Pseudomonas aeruginosa* + *Staphylococcus sp.*; em 3,44%, *Escherichia coli* e, em 6,89%, *Proteus morganii*.

O fato de não se ter obtido crescimento de colônias em 100% dos casos pode estar condicionado, principalmente, a duas variantes: volume da amostra sanguínea coletada e mecanismos de defesa do hospedeiro.

CHANDRASEKAR et al. (1994), afirmam que o volume de sangue coletado é o fator mais importante que afeta a sensibilidade das hemoculturas.

ILSTRUP et al. (1983), em estudo em seres humanos com mais de 5.000 hemoculturas positivas, constataram que a positividade de culturas com 20 e 30 ml de amostras de sangue eram 38% e 62% maiores, respectivamente, do que de 10 ml de sangue.

Por outro lado, WAITZBERG et al. (1991), em estudo sobre peritonite experimental em ratos utilizando diferentes concentrações de *Escherichia coli*, demonstrou a presença de bacteremia em 100% dos casos, confirmada pela hemocultura (punção da veia caudal) realizada 6 horas após inoculação intraperitoneal da suspensão bacteriana.

Analisando-se os resultados do estudo bacteriológico, verificou-se o isolamento de diferentes microrganismos, destacando-se a presença de microrganismos da flora gastrointestinal. Esses resultados apontam, provavelmente, para duas explicações: contaminação no momento da coleta ou translocação bacteriana.

BERG (1980, 1985) e HETGES (1986), definem translocação bacteriana como sendo a passagem de bactérias viáveis do trato gastrointestinal através da mucosa epitelial intacta para linfonodos mesentéricos, sangue e outros órgãos.

Em animais experimentais adultos saudáveis, a translocação bacteriana (proveniente do trato gastrointestinal) não ocorre ou ocorre apenas em níveis muito baixos e é eliminada pelo sistema imune de defesa do hospedeiro. Em circunstâncias especiais, onde haja imunodepressão, a infecção bacteriana pode ter origem na própria flora intestinal ou mesmo ser agravada por ela (PENN et al., 1985).

Estudos baseados em modelos reprodutíveis de peritonite e sobre a translocação bacteriana poderão proporcionar fundamentais esclarecimentos sobre a fisiopatologia, bem como tratamento dessa grave entidade mórbida.

Propõe-se, então, a continuidade nesta linha de pesquisa, destacando as altas taxas de morbidade e mortalidade frente ao quadro de peritonite aguda infecciosa.

## 6 CONCLUSÕES

Conclui-se, com base nas análises realizadas, que:

- todos os animais injetados com suspensão bacteriana contendo  $2 \times 10^9$  UFC/ ml de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 apresentaram alterações clínicas compatíveis com infecção peritoneal e sepse;
- nos animais que foram a óbito, a presença de *Pseudomonas aeruginosa* - evidenciada no estudo bacteriológico e na hemocultura - foi a principal causa das infecções peritoneal e pleural, da sepse e da mortalidade;
- os animais do grupo experimental, submetidos a bloqueio transdiafragmático prévio com membrana celulósica, apresentaram evidências estatisticamente significativas de maior sobrevida ( $p=0,0264$ ;  $p=0,0211$ ) e menor frequência de derrame pleural ( $p=0,0001$ ).

## REFERÊNCIAS

ANDERSON, R.; TRANBERG, K.; ALWMARK, A; et al. Factors influencing the outcome of *Escherichia coli* in rats. **Acta Chir. Scand.**, Stockholm, v. 155, p. 155-157, 1989.

ANDERSON, R.; TRANBERG, K.; BENCMARK, S.; et al. Roles of bile and bacteria in biliary peritonitis. **Br. J. Surg.**, Cuilford, v. 77, p. 36-39, 1990.

ARAÚJO JR., L.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.

BAKER, CC; CAINES, H O.; BAUE, AE .. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecalligation and puncture model. **Surgery**, St. Louis, v. 94, n. 2, p. 331-335, 1983.

BARTLETT, J.G.; ONDERDONK, AB; LOUIE, T; et al. Lessons from an animal model of intra-abdominal sepsis. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 113, p. 853-857, Jul. 1978.

BERG, R.D. Mechanisms confining indigenous bacteria to the gastrointestinal traet. **Am. J. Clin. Nutrg.**, Bethesda, v. 33, p. 2472-2484, Nov. 1980.

BERG, R.D. Bacterial translocation from the intestines. **Jikken Dobutsu**, Tokyo, v. 34, p. 1-16, 1985.

BRAUDE, A.E.; SIEMIENSKI, J.; WILLIAMS, O.; et al. Overwhelming baeteremic shock produced by gram-negative bacilli: a report of four cases with one recove'Y. **Univ. Mich. Med.Bull**, v.19, p. 23, 1953.

BORDEN, C.W.; HALL, W.H. Fatal transfusion reactions from massive bacterial contamination of blood. **New Engl. J. Med.**, v. 245, p. 760, 1951.

BOUCHET, Y.; VOILIN, C; YVER, R. The peritoneum and its anatomy.In: Bengmark, (Ed.). **The peritoneum and peritoneal access**. London: Wright, p. 1-13, 1989.

BOVIN, A. **In baderies et virus**. Paris: Presses Universitaires de France, 1941.

BROWNE, M.K; LESLIE, G.B. Animal models of peritonitis. **Surg. Gynecol. Obstet.**, Chicago, v. 143, p. 738-740, Nov. 1976.

BURNET, W.E & BRONWM JR, C.R. The treatment of peritonitis using peritoneallavage. **Ann. Surg.**, Philadelphia, v. 145, n. 5, p. 675-862, May. 1957.

CELDRÁN, A.U.; INARREA, P.L.; MARIJUNA, L.M., et al. Effect of povidine iodine and chlorhexidine on the mortality and baeterial clearence in the abdominal cavity of peritonitic rats. **Eur. J. Surg.**, Madri, v. 157, p. 393-395, 1991.

CELDRÁN, A.U.; MERONO, E.A.C.; FERNANDEZ, J.S.; et al. El peritoneo y su respuesta frente a las bacterias. **Rev. Esp. Enferm. Dig.**, Madri, v. 84, n. 2, p. 109-115, 1993.

CHANDRASEKAR, P.H.i BROWN, W.J. Clinical aspects of hemoculturs. **Arch. Intern. Med.**, Chicago, v. 154, p. 841-849, 1994.

CLOWES, G.H.A.; O'DONNELL, T.F.; BLACKBURN, G.L.; et al. Energy metabolism and proteolysis in traumatized and septic man. **Surg. Clin. North Am.**, Philadelphia, v. 56, p. 1169, 1976.

CROOK, J.N.; COTLAR, AM.; BORNSIDE, G.H.; et al. Intraperitoneal cephalotin in the treatment of experimental appendiceal peritonitis. **Am. Surg.**, Philadelphia, v. 34, n. 10, p. 736-739, Oct. 1968.

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

DUMONT, AE.; MASS, W.K.; ILIESCU, H.; et al. Increased survival from peritonitis after blockade of transdiaphragmatic absorption of bacteria. **Surg. Gynecol Obstet.**, Chicago, v.162, p. 248-252, 1986.

DUNN, D.L.; BARKE, R.A.; KMCHT, N.B.; et al. Role of resident macrophages, peripheral neutrophils, and translymphatic absorption in bacterial clearence from the peritoneal cavity. **Infed. Immun.**, Washington, v. 49, p. 257-264, Aug. 1985.

DUNN, D.L.; BARKE, R.A.; EWALD, D.C.; et al. Macrophages and translymphatic absorption represent the first line of host defense of the peritoneal cavity. **Arch. Surg.**, Chicago, v. 122, p. 105-110, Ian. 1987.

FOWLER, E.R. Diffuse septic peritonitis with special reference to new method of treatment, namely, the elevated head and trunk posture, to facilitate drainage into the pelvis. With a report of nine consecutive cases pf recovery. **Medical Records**, 57:617-620, 1900.

FREIRE, AN.M.; KOBATA, C.M.; TOLEDO, RE: et al. Formação de abscesso experimental em ratos. **Acta Ciro Bras.**, São Paulo, v. 4, supl. 1, p. 19-20, 1989.

FROIDEFOND, S.; SAIVIN, S.; LEMOZY, J.: et al. Resistance to antibiotic treatment produced in a model of experimental *Pseudomonas aeruginosa* peritonitis. **Pathol. Biol.**, Paris, v. 40, n. 5, p. 573-582, May. 1992.

GRECA, F.H.; SOUZA FILHO, Z.A.; ARAÚJO, C.F.R.; et al. Peritonite experimental em ratos. Bloqueio da absorção transdiafragmática. **Act. Ciro Bras.**, São Paulo, v. 9, n. 1, p. 22-24, 1994.

GUILGEN, G.A. **Peritonite infecciosa com quantitativos e qualitativos bacterianos conhecidos**: modelo experimental em ratos. Dissertação (Mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1992.

HENTGES, D.J. The protective function of the indigenous intestinal flora. **Pediatr. Infect. Dis. J.**, Baltimore, v. 5, supl. 1, p. 517-520, 1986.

ILSTRUP, D.M.; WASHINGTON, J.A.II. The importance of volume of blood culture in the detection of bacteremia and fungemia. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, New York, v. 1. p. 107-110, 1983.

KAZMI, H.R.; RAFFONE, F.D.; KLICER, AS.; et al. *Pseudomonas* exit site infections in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients. **J. Am. Soc. Nephrol.**, Baltimore, v. 2, n. 10, p. 1498-501, Apr. 1992.

KELLY, M.J. A guinea-pig model demonstrating synergy between *Escherichia coli* and *Bacteroides fragilis* in infected surgical wounds. In: HILL, p. 79-83, M.J. (Ed.). **Models of Anaerobic Infection**. Dordrecht: Martinus Nijhoff, 1984.

LILL, S.R.; PARSONS, R.H.; BUHAC, I. Permeability of the diaphragm and fluid resorption from the peritoneal cavity in the rat. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 76, n. 5, p. 997-1001, May. 1979.

MAINGOT, R. **Abdominal Operations**, 7. Ed. New York: Appleton-Century-Crofts, 1980.

MINAO, O. **Estudo do contraste baritado introduzido na cavidade peritoneal e sua absorção pelo sistema linfático em cães**. Dissertação (mestrado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1992.

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.

ONDERDONK, AB.; WEINSTEIN, W.M.; SULLIVAN, N.M.; et al. Experimental intra-abdominal abscess in rats: quantitative bacteriology of infected animals. **Infect. Immun.**, Washington, v.10, p.1256-1259, Dec.1974.

PENN, R.L.; MACA, R.D.; BERG, R.D. Increased translocation of bacteria from the gastrointestinal tracts of tumor-bearing mice. **Infect. Immun.**, Washington, v 47, n. 3, p. 793-798, Mar. 1985.

RIBAS FILHO, J.M. **Alterações morfológicas na vigência de peritonite aguda: estudo experimental em ratos.** Tese (Doutorado em Clínica Cirúrgica) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 1994.

ROCHA, J.J.R. Infecção peritoneal. Modelo experimental em cobaias. **Acta Ciró Bras.**, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 12-20, 1986.

SAAD, F. Infecção peritoneal modelo experimental em ratos. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 1, p. 10-18, 1986.

SHARBAUGH, R.J.; RAMBO, W.M. A new model for producing experimental fecal peritonitis. **Surg. Gynecol. Obstet.**, Chicago, v.133, p. 433-437, 1971.

SIMÕES, J.C, POLONIO, B.; NETO, CS.; et al. Aspectos morfológicos da reação tecidual da película celulósica inserida em esplenectomia parcial, hepatectomia parcial e no jejuno: estudo experimental em cães. **Acta.Cir.Bras.**, São Paulo, 5:88-93, 1990.

STEINBERG, B. Infections of the peritoneum. New York: **Paul Hoeber Inc.**, 455 p., 1944.

WAITZBERG, D.L.; OKU, S.M.M.; SOARES, S.R.C; et al. Padronização de um modelo de peritonite em ratos. **Acta Ciró Bras.**, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 37-40, 1991.

WICHTERMAN, K.A.; BAUE, A.E.; CHAUDRY, I.H. Sepsis and septic shock - A review of laboratory models and a proposal. **J. Surg. Res.**, New York, v. 29, p. 189-201, Aug. 1980.

**ANEXOS**



**Grupo Controle**  
***Product-Limit Survival Estimates***

Tempo	Survival	Failure	Erro Pad. Survival	Nº Failed
0.00	1.0000	0	0	0
495.00	0.9474	0.0526	0.0512	1
515.00	-	-	-	2
515.00	0.8421	0.1579	0.0837	3
620.00	0.7895	0.2105	0.0935	4
625.00	0.7368	0.2632	0.1010	5
660.00	-	-	-	6
660.00	0.6316	0.3684	0.1107	7
670.00	0.5789	0.4211	0.1133	8
720.00	0.5263	0.4737	0.1145	9
780.00	0.4737	0.5263	0.1145	10
900.00	0.4211	0.5789	0.1133	11
960.00	-	-	-	12
960.00	0.3158	0.6842	0.1066	13
2880.00*	-	-	-	13
2880.00*	-	-	-	13
2880.00*	-	-	-	13
2880.00*	-	-	-	13
2880.00*	-	-	-	13
2880.00*	-	-	-	13

\* Censored Observation

Quantiles	75%	Mean	781.05
	50%	Standard Error	42.06
	25%		



**Sumário do nº de censurados e não-censurados**

<b>GRUPO</b>	<b>Total</b>	<b>Failed</b>	<b>Censuras</b>	<b>%Censored</b>
Controle	19	13	6	31.5789
Experimental	22	8	14	63.6364
Total	41	21	20	48.7805