

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

EXPERIMENTAL PERITONITIS IN RATS: TRANSDIAFRAGMATIC BLOCKAGE WITH CELLULOID MEMBRANE

Leônidas Noronha Silva, ACBC-PR¹
Márcio Barboza Cardoso²
João Francisco L. Gondek³
Luciana Bertoli Esmanhotto³
Ana Paula Martins Sebastião³
João Carlos Simões, TCBC-PR⁴

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 g. Os animais foram alocados em dois grupos: grupo A ou controle (n=19), e grupo B ou experimental (n=22). Os animais do grupo B, após indução anestésica inalatória, foram submetidos a laparotomia e bloqueio da superfície peritoneal diafragmática com membrana celulósica e mantidos sob condições *ad libitum* 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 10⁹ UFC/ml (American Type Culture Collection – ATCC 25853), na proporção de 1ml de suspensão para cada 100 g de peso. Sempre que se detectou o óbito, o animal foi submetido a necropsia para avaliação macroscópica da cavidade peritoneal e pleural, bem como coleta de conteúdo pleural e punção intracardíaca para cultura. Os animais sobreviventes foram sacrificados após 48 horas e, também, submetidos a necropsia e coleta de material para avaliação bacteriológica. Verificaram-se em todos os animais sinais clínicos característicos do estado séptico evolutivo. A incidência de derrame pleural observada no grupo controle em relação ao grupo experimental foi, respectivamente, 18 (94,7%) e oito (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, demonstrando maior sobrevida 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, estatisticamente significante, quando comparados aos animais não submetidos ao bloqueio.

Unitermos: Peritonite; Cavidade peritoneal; Linfáticos diafragmáticos.

INTRODUÇÃO

A grande frequência clínica e os pobres resultados frequentemente obtidos no tratamento da peritonite bacteriana aguda enfatizam a necessidade de pesquisas nas áreas de fisio-

patologia e de tratamento dessa grave condição mórbida. A limitação ética nos trabalhos em *anima nobili* incentiva o desenvolvimento de modelos experimentais passíveis de serem reproduzidos com facilidade e fidedignidade. A literatura consigna vários modelos experimentais utilizados na indução

1. Médico do Serviço de Oncologia do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba.
2. Médico Residente (R2) do Serviço de Oncologia do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba.
3. Acadêmico da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.
4. Chefe do Serviço de Oncologia do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba. Professor Titular de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.

Recebido em 10/4/97

Aceito para publicação em 11/8/97

Trabalho realizado no Laboratório da Disciplina de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da Faculdade Evangélica de Medicina do Paraná.

de peritonite e septicemia: inoculação de material fecal fresco,¹ cerclagem e punção do ceco,² implantação de cápsula gelatinosa contendo suspensão bacteriana,^{3,4,5} inoculação de suspensões bacterianas qualitativas e quantitativas conhecidas,⁶ incisão transversal padronizada no ceco.⁷

Dumont et al⁸ descreveram a importante ação da membrana peritoneal diafragmática quando da presença de bactérias livres na cavidade abdominal. Essa resposta baseia-se na absorção de microrganismos através dos estomas linfáticos diafragmáticos, que ocorre, principalmente, pela existência de um gradiente de pressão entre o espaço subfrenico e a cavidade peritoneal.⁹ Na vigência de uma importante proliferação microbiana na cavidade peritoneal, a absorção transdiafragmática se converte na principal via de disseminação de bactérias e endotoxinas capazes de desencadear falência de múltiplos órgãos e conseqüente morte por septicemia.¹⁰

O objetivo deste trabalho foi a indução de peritonite aguda por inoculação intraperitoneal de suspensão bacteriana qualitativa e quantitativa predeterminada 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 sobrevida nesses grupos de animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais de experimentação

Foram utilizados 41 ratos Wistar, adultos, machos, com peso variando de 118 a 399 g, alocados em dois 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 semipermeável.

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

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. Para a anti-sepsia, utilizou-se solução de polivinilpirrolidona-iodo a 10%. Realizou-se celiotomia por incisão ogival 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. A membrana celulósica estéril, previamente preparada, foi colocada com o auxílio de pinças atraumáticas delicadas, recobrimdo toda a superfície diafragmática abdominal (Figura 1).

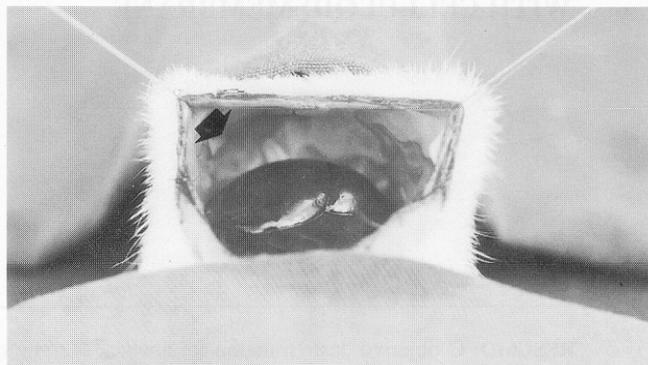


Figura 1 – Colocação da membrana celulósica sobre o diafragma

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 em condições de *ad libitum* 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 estudos pilotos preliminares.

Preparo da suspensão bacteriana

Utilizou-se cepa de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC), obtida de amostras liofilizadas do American Type Culture Collection, Atlanta – USA. As amostras foram suspensas em caldo Tryptic Soya Broth (TSB) para reativação das cepas. As suspensões de *Pseudomonas aeruginosa* foram subcultivadas em placas de Cistina Lactose Eletrólito Deficiente (CLED) 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 10⁹ bactéria/ml, utilizando-se o padrão n° 9 da escala de MacFarland (turbidimetria), e medidas fotometricamente.

A quantidade injetada foi de 1ml de suspensão bacteriana para cada 100 g de peso dos ratos. A suspensão bacteriana continha 2,7 x 10⁹ UFC/ml de *Pseudomonas aeruginosa*.

Sacrifício dos animais

Nos animais que foram a óbito determinou-se o tempo de sobrevida e realizou-se 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.

Observação macroscópica

Os animais foram submetidos primeiramente a toracotomia transversa bilateral para fins de investigação da cavidade pleural. Considerou-se como derrame pleural a existência 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 a fibrina e odor fétido. Em tais procedimentos, utilizou-se técnica asséptica.

Coleta de material

Na vigência de derrame pleural, realizou-se coleta do material com o auxílio de seringa de 3,0ml e agulha 25mm x 7mm estéreis, o qual imediatamente era injetado em caldo TSB para transporte. A seguir, em todos os animais foi realizada a punção intracardíaca com seringa e agulha estéreis semelhantes às anteriores. A amostra sanguínea coletada, aproximadamente 1,0ml, era injetada em meio de transporte TSB e encaminhada para cultura.

Metodologia estatística

Empregou-se análise estatística adequada para a amostra, que consistiu de dois métodos: teste qui-quadrado de Pearson e teste não-paramétrico de Kaplan-Meier.

RESULTADOS

Avaliação clínica no período pós-indução de peritonite

No período pós-indução de peritonite, os animais foram avaliados por meio de observação clínica. 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.

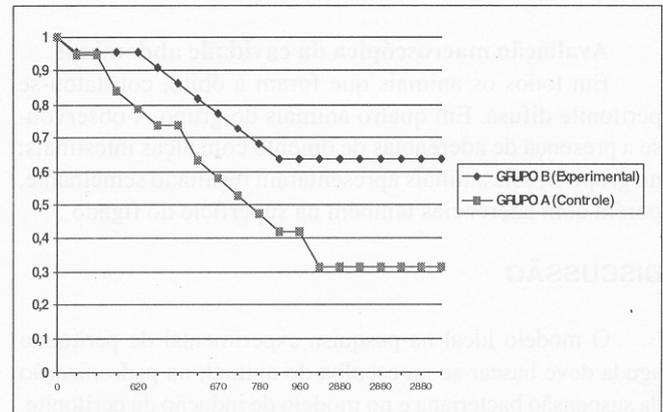
Avaliação da mortalidade

No grupo A, 13 animais (68,42%) foram a óbito: oito morreram antes de 12 horas e cinco entre 12 e 48 horas após a inoculação da suspensão bacteriana. No grupo B, oito animais (36,36%) apresentaram óbito: quatro morreram antes de 12 horas e quatro entre 12 e 48 horas.

Realizou-se análise estatística da curva de sobrevivência por meio do método não-paramétrico de Kaplan-Meier. Pelos resultados obtidos há evidências estatisticamente significantes

de maior sobrevivência nos animais do grupo B, $p = 0,0264^*$ e $p = 0,0211^*$. Esses resultados são apresentados no gráfico 1.

Gráfico 1
Testando a homogeneidade da curva de sobrevivência



Teste de Kaplan-Meier: $p = 0,0264^*$; $p = 0,0211^*$

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 um unilateral à esquerda; no grupo B, observaram-se oito derrames pleurais bilaterais.

Para inferência estatística adequada da amostra utilizou-se o teste de qui-quadrado de Pearson. Pela análise dos dados há evidências estatisticamente significantes de menor frequência de derrame pleural nos animais do grupo B, $p = 0,0001^*$. Os resultados são apresentados na tabela 1.

Tabela 1
Incidência de derrame pleural nos grupos de animais

	A (Controle)	B (Experimental)
Derrame pleural bilateral	18#	8
Sem derrame pleural	1	14
Total (N)	19	22

(#) Um caso de derrame pleural unilateral à esquerda.
Teste qui-quadrado de Pearson: $X^2 = 14,97$ $p = 0,0001^*$

Estudo bacteriológico do derrame pleural

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

Houve crescimento de colônias em todos os casos, sendo *Pseudomonas aeruginosa* em 23 animais (88,46%), *Pseudomonas aeruginosa* + *Staphylococcus sp* em dois animais (7,69%) e *Escherichia coli* em um animal (3,84%),

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.*, um caso (3,44%); *Escherichia coli*, um caso (3,44%); *Proteus morganii*, dois casos (6,89%).

Avaliação macroscópica da cavidade abdominal

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

DISCUSSÃO

O modelo ideal na pesquisa experimental de peritonite aguda deve basear-se na escolha do animal, na padronização da suspensão bacteriana e no modelo de indução da peritonite.

Para indução de peritonite realizamos punção percutânea da cavidade abdominal; esse método é seguro, de fácil execução, além de pouco dispendioso. A importância de se trabalhar com suspensão bacteriana qualitativa e quantitativa predefinida é a de permitir condições reprodutíveis e, consequentemente, coerência nos resultados e conclusões.⁵

Na vigência de peritonite ocorre aumento da absorção de bactérias e endotoxinas pelos estomas linfáticos da membrana peritoneal diafragmática, capaz de desencadear falência de múltiplos órgãos.^{9,10} Esse fato condiciona a diminuição da eficaz ação de filtro do sistema mononuclear fagocitário hepático.

A partir dos dados analisados na curva de sobrevivência, podemos concluir que há evidências estatisticamente significantes de que os animais do grupo B apresentaram maior sobrevida quando comparados aos animais do grupo A ($p = 0,0264^*$; $p = 0,0211^*$). Esses resultados são corroborados pelos dados publicados por outros autores.⁷

Em todos os animais do grupo B, constatamos a presença de aderência total entre a superfície do fígado e a superfície peritoneal diafragmática demonstrando, assim, a ação de bloqueio da absorção transdiafragmática nos animais do grupo B. Nesse grupo, em dez animais (45,45%), observamos presença de granulomas na região subfrênica.

Simões et al,¹¹ 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 e granulomas tipo corpo estranho entre as vísceras abdominais.

O derrame pleural, na vigência de peritonite aguda, é considerado como um importante indicador de mal prognóstico.¹² Em nosso estudo constatamos menor frequência, estatisticamente significativa, de derrame pleural nos animais do grupo B em relação ao grupo A ($p = 0,0001^*$). Em todos os animais nos quais se constatou derrame pleural, foi realizada coleta e análise bacteriológica para fins de resgate da bactéria previamente inoculada. Verificamos um total de 26 derrames pleurais, detectando-se crescimento de germes em 100% das culturas. Em estudo piloto preliminar não constatamos derrame pleural em animais submetidos exclusivamente ao bloqueio da superfície peritoneal diafragmática com membrana celulósica.

A punção intracardíaca e a hemocultura foram realizadas em todos os animais, sendo detectado crescimento de colônias em 70,73% dos casos. 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.

O fator de maior relevância afetando a sensibilidade das hemoculturas é o volume de sangue coletado, segundo alguns autores;¹³ Também em estudo em seres humanos com mais de 5 mil hemoculturas positivas, é descrita a positividade de culturas com 20ml e 30ml de amostras de sangue 38% e 62% maiores,¹⁴ respectivamente, do que de 10 ml.

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

Em animais de experimentação adultos e sadios, a transmigração bacteriana (proveniente do trato gastrointestinal) não ocorre ou ocorre apenas em níveis muito baixos e é eliminada pelo sistema imune de defesa do hospedeiro. Porém, em circunstâncias onde haja imunodepressão, a infecção bacteriana pode ter origem na própria flora intestinal ou mesmo ser agravada por ela.¹⁵

Conclui-se, com base nas análises realizadas, que todos os animais injetados com suspensão bacteriana contendo $2,7 \times 10^9$ UFC/ml de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 apresentaram alterações clínicas compatíveis com infecção peritoneal e sepse. Os animais do grupo experimental, submetidos a bloqueio transdiafragmático prévio com membrana celulósica, apresentaram evidências estatisticamente significantes de maior sobrevida ($p=0,0264$; $p=0,0211$) e menor frequência de derrame pleural ($p=0,0001$).

ABSTRACT

The aim 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 g. 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 B, after inalatory anesthetic, were submitted to laparotomy and diaphragmatic blockage of the peritoneum surface with celluloid membrane and kept under ad libitum 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 (American Type Culture Collection - ATCC 25853). The dosage was 1 ml of the suspension for every 100 g 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 were sacrificed after forty-eight hours and also submitted to necropsy and material collection for bacteriologic evaluation. It was verified that all the animals had objective clinical signs of sepsis in evolution. The incidence of pleural effusion observed in the control group and experimental group was, respectively, 18 (94,7%) and 8 (36,4%), ($p=0.0001$). To study the survival rate, the Kaplan-Meier method was used, and the result was a higher survival rate in group B, ($p=0,024$; $p=0.0211$). The present study demonstrated that the animals submitted to previous transdiaphragmatic blockage with celluloid membrane, had a higher survival rate and less frequency of pleural effusion, statistically significant, when compared with the animals not submitted to the blockage.

Key Words: Peritonitis; Peritoneal cavity; Diaphragmatic lymphatics.

REFERÊNCIAS

1. Onderdonk AB, Weinstein WM, Sullivan NM, et al – Experimental intra-abdominal abscess in rats: quantitative bacteriology of infected animals. *Infect Immun* 1974;10:1.256-1.259.
2. Baker CC, Gaines HO, Baue AE – Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. *Surgery* 1983;2:331-335.
3. Nichols RL, Smith JW, Balthazar ER – Peritonitis and intrabdominal abscess: an experimental model for the evaluation of human disease. *J Surg Res* 1978;25:129-134.
4. Freire ANM, Kobata CM, Toledo RF, et al – Formação de abscesso experimental em ratos. *Acta Cir Bras* 1989;4:19-20.
5. Waitzberg DL, Oku SMM, Soares SRC, et al – Padronização de um modelo de peritonite em ratos. *Acta Cir Bras* 1991;6:37-40.
6. Guilgen GA – 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.
7. Greca FH, Souza Filho ZA, Araújo CFR, et al – Peritonite experimental em ratos. Bloqueio da absorção transdiafragmática. *Acta Cir Bras* 1994;9:22-24
8. Dumont AE, Mass WK, Iliescu H, et al – Increased survival from peritonitis after blockade of transdiaphragmatic absorption of bacteria. *Surg Gynecol Obstet* 1986;162:248-252.
9. Celdran AU, Inarrea PL, Marijuna LM, et al – Effect of povidine iodine and chlorhexidine on the mortality and bacterial clearance in the abdominal cavity of peritonitic rats. *Eur J Surg* 1991; 157:393-395.
10. Celdran AU, Merono EAC, Fernandez JS, et al – El peritoneo y su respuesta frente a las bacterias. *Rev Esp Enferm Dig* 1993;84(2): 109-115.
11. Simões JC, 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* 1990;5:88-93.
12. Araújo Jr JC – Avaliação do uso tópico da clorhexidina na peritonite fecal induzida em ratos. *Acta Cir Bras* 1987;2(2):55-63.
13. Chandrasekar PH, Brown WJ – Clinical aspects of hemoculturs. *Arch Intern Med* 1994;154:841-849.
14. Ilstrup DM, Washington JA II – The importance of volume of blood culture in the detection of bacteremia and fungemia. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1983;1:107-110.
15. Penn RL, Maca RD, Berg RD – Increased translocation of bacteria from the gastrointestinal tracts of tumor-bearing mice. *Infect Immun* 1985;47(3):793-798.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Dr. Leônidas Noronha Silva
Rua Santa Catarina, 220
80620-100 – Curitiba – PR