

MARCOS CÉLIO BROCCO

**EFEITOS DA UTILIZAÇÃO INTRAPERITONEAL DE ROPIVACAÍNA 0,2% NA
SOBREVIDA DE RATOS SUBMETIDOS À PERITONITE FECAL.**

**Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte - Minas Gerais
2012**

MARCOS CÉLIO BROCCO

**EFEITOS DA UTILIZAÇÃO INTRAPERITONEAL DE ROPIVACAÍNA 0,2% NA
SOBREVIDA DE RATOS SUBMETIDOS À PERITONITE FECAL.**

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

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO ANATOMOFISIOPATOGENIA CIRÚRGICA

ORIENTADOR: RENATO SANTIAGO GOMEZ

CO-ORIENTADOR: DANILO NAGIB SALOMÃO PAULO

Faculdade de Medicina

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte-Minas Gerais

2012

II

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora: Prof^a. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Renato de Lima dos Santos

Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Francisco José Pena

Vice-Diretor da Faculdade de Medicina: Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof. Manoel Otávio da Costa Rocha

Subcoordenador do Centro de Pós-Graduação: Prof^a. Tereza Cristina de Abreu Ferrari

Coordenador do Programa de Pós graduação em Ciências Aplicadas á Cirurgia e à Oftalmologia: Prof. Marcelo Dias Sanches

Subcoordenadora do Programa de Pós graduação em Ciências Aplicadas á Cirurgia e à Oftalmologia: Prof^a. Ivana Duval de Araújo

Chefe do Departamento de Cirurgia: Prof. Marcelo Eller Miranda

Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia

Prof. Marcelo Dias Sanches

Prof. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Renato Santiago Gomez

Prof. Tarcizo Afonso Nunes

Prof^a. Ivana Duval Araujo

Prof. Eduardo Ângelo Braga (Disc. Titular)

DEDICATÓRIA

A meu pai, “*in memoriam*”, e minha mãe que souberam conduzir meu desenvolvimento intelectual desde os primeiros passos de minha vida como pessoa até o culminar de minha formação profissional, ao receber o grau de médico,

A minha esposa, Luzianny mãe dedicada, e fiel companheira, meu obrigado pelo incentivo e compreensão no dia a dia do desenrolar de meus afazeres em desenvolver esta pesquisa,

Aos meus filhos, Pedro e Paulo que muito me incentivaram em continuar desenvolvendo o presente estudo.

HOMENAGEM ESPECIAL

Ao Professor Renato Santiago Gomez, meu orientador que não mediu esforços para que esta pesquisa fosse realizada.

Em especial, ao Professor Danilo Nagib Salomão Paulo meu co-orientador pelo incentivo e apoio.

Ao Professor Alcino Lázaro da Silva que dedicou toda sua vida acadêmica em conseguir qualificação profissional para os que militam na Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao Professor Arildo Benedicto dos Santos Abreu “*in memoriam*” meu mestre, que foi responsável por minha formação e iniciação na Arte e Ciência da Anestesiologia.

A Professora Isabel Cristina Andreatta Paulo “*in memoriam*” pelo incentivo a minha qualificação profissional.

Ao Professor Antônio Roberto Carraretto e ao médico Carlos Eduardo David de Almeida que tanto me ajudaram na elaboração deste trabalho

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos, João Florêncio de Abreu Baptista e João Batista Pozzato Rodrigues, que muito me incentivaram a continuar este estudo.

Aos meus colegas de Trabalho, Robson Quintino da Silva, José Carlos Binda, Nelson Mallaco Filho, Amilton Cerqueira, Sigmar Áurea Cabral, Erick Freitas Curi e Cristina Hybner de Souza Batisti “*in memoriam*” que souberam compreender as minhas faltas ao serviço em benefício do desenvolvimento de meu trabalho.

A Professora Andréa Teixeira e a Mestre Amanda Cardoso de Oliveira Silveira do Centro de Pesquisa René Rachou de Belo Horizonte, pela grande importância no desenvolvimento desta pesquisa.

Ao Instituto de Pesquisa da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (Emescam) que através de seu Departamento de Apoio à Pesquisa Clínica e Experimental não mediu esforços em ajudar a desenvolver este trabalho.

Aos colegas residentes do Centro de Ciências da Saúde/UFES que muito me incentivaram a realizar esta tese.

Enfim, a todos meus colegas de trabalho do Centro Cirúrgico do HUCAM (Hospital Universitário Cassiano Antônio Moraes), e em especial aos Patologistas Diego Antonio Colodetti e João Cremasco, pela dedicação dispensada no desenrolar deste trabalho.

“ Louvado sejas meu Senhor,
por nossa irmã a morte corporal
da qual homem nenhum pode escapar.”

S. Francisco.

BROCCO MC. Efeitos da utilização intraperitoneal de ropivacaína 0,2% na resposta inflamatória, histopatologia e na sobrevivência de ratos submetidos à peritonite fecal. Belo Horizonte, 2012. 65 p. Tese (Doutorado em Medicina) – Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

RESUMO

OBJETIVO: Avaliar a sobrevivência, o aspecto histopatológico do pulmão, peritônio e fígado, e as dosagens séricas das citocinas IL-6 e TNF- α em ratos submetidos à peritonite fecal e tratados com lavagem peritoneal com ropivacaína 0,2%. **MÉTODOS:** Utilizaram-se 36 ratos Wistar, pesando entre 280 e 320 g divididos em dois grupos A (n=20) e B (n=16), submetidos a laparotomia seis horas após a indução de peritonite fecal e distribuídos, aleatoriamente, em quatro subgrupos de cinco (Grupo A) e quatro (Grupo B) ratos: I- Controle, nenhum tratamento; II- enxugamento da cavidade abdominal; III- Lavagem da cavidade abdominal com 3 mL de soro fisiológico 0,9% e enxugamento ; IV- Lavagem da cavidade abdominal com 3 mL de ropivacaína 0,2% e enxugamento. No grupo A os animais que morreram foram necropsiados e o horário do óbito foi anotado. Os animais sobreviventes foram mortos no 11º dia do pós-operatório e realizou-se a necropsia com retirada de fragmentos de fígado, pulmões e peritônio para estudo histopatológico. No grupo B, seis horas após a laparotomia os animais foram submetidos à punção cardíaca com retirada de 1 mL de sangue para dosagem das citocinas e, a seguir eutanasiados. **RESULTADOS:** Os animais do grupo A que receberam lavagem peritoneal (subgrupos III e IV) apresentaram maior sobrevivência que os subgrupos (I e II). A lavagem com ropivacaína 0,2% reduziu a mortalidade e manteve o pulmão, peritônio e fígado sem alterações histológicas importantes. No grupo B a lavagem com ropivacaína apresentou valores de TNF- α menores do que os observados com os outros tratamentos ($p < 0,05$). Em relação aos valores da IL-6, o subgrupo da ropivacaína apresentou valores menores que os observados com os subgrupos I e II, mas não houve diferença estatística ($p > 0,05$) em relação ao subgrupo III. **CONCLUSÃO:** A lavagem peritoneal com ropivacaína a 0,2% no tratamento da peritonite fecal em ratos reduziu a mortalidade e as alterações histológicas relacionadas à resposta inflamatória como também reduziu os níveis plasmáticos de IL-6 e do TNF- α .

Palavras-Chaves: Ropivacaína; IL-6; TNF- α ; Histopatologia; Peritonite; Ratos; Sobrevida.

BROCCO MC. Effects of intraperitoneal ropivacaine 0,2% in the inflammatory response, histopathology and in the survival of rats subjected to fecal peritonitis. Belo Horizonte, 2012. 65 p. Thesis (PhD degree in Medicine) – Medical School of the Universidade Federal de Minas Gerais.

ABSTRACT

OBJECTIVE: To evaluate the survival, the histopathological features in lungs, peritoneum, liver and to assess the cytokine serum levels of IL-6 and TNF- α in rats subject to fecal peritonitis and treated with peritoneal lavage with 0,2% ropivacaína by peritoneal lavage.

METHODS: We subject 36 Wistar rats (280-320 g) divided in two groups A (n=20) and B (n=16) to laparotomy six hours after the induction of fecal peritonitis with autogenous stool and subsequently divided the rats randomly into four subgroups of five (Group A) and four (Group B) animals: I- Control , no treatment; II- Drying of the abdominal cavity; III- Lavage of abdominal cavity with 3 mL of 0,9% normal saline and drying; IV- Lavage of the abdominal cavity with 3 mL of 0,2% ropivacaína and drying. In the group A the animals of that died underwent necropsy, and the surviving ones were subjected to euthanasia on the 11th day post-surgery. Fragments of liver, lungs and peritoneum were removed for histological evaluation. In the group B six hours following the laparotomy, the animals underwent cardiac puncture, and 1 mL of blood was collected for cytokine assessment before the animals were euthanized. **RESULTS:** The animals of group A that received peritoneal lavage (subgroups III and IV) showed greater survival than the drying and control subgroups. Lavage with ropivacaína prevent dead and maintained the architecture of the lung, peritoneum and liver without any important histological alterations. In the group B the lavage with ropivacaína resulted in smaller TNF- α levels compared with those observed in other treatment groups ($p < 0,05$). Regarding IL-6 ropivacaína group showed lower cytokine levels than those observed in groups I and II, but there was no significant difference ($p > 0,05$) between subgroups III and IV. **CONCLUSION:** Peritoneal lavage with 0,2% ropivacaína demonstrates a reduction the mortality and histopathological alterations related to inflammatory response and was show to reduce plasma levels of IL-6 and TNF- α .

Keywords: Ropivacaína; IL-6; TNF- α ; Histological features; Peritonitis; Rats; Survival

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Punção abdominal em rato para inoculação de suspensão de fezes e solução salina.	11
Figura 2	Peritonite purulenta em rato 6 horas após a inoculação de fezes autógenas.	11
Figura 3	Ilustração do método de Citometria de Fluxo.	14
Figura 4	Curva de sobrevivência entre subgrupos	16
Figura 5	Microfotografia de peritônio de rato do subgrupo III (lavagem da cavidade abdominal com soro fisiológico 0,9% e enxugamento), com inflamação granulomatosa do tipo corpo estranho. Coloração (HE) aumento 10X.	17
Figura 6	Microfotografia de peritônio de rato do subgrupo III (lavagem da cavidade abdominal com soro fisiológico a 0,9% e enxugamento), com inflamação crônica e áreas de necrose central. Coloração (HE) aumento 4X.	18
Figura 7	Microfotografia de peritônio de rato do subgrupo IV (lavagem da cavidade abdominal com ropivacaína a 0,2% e enxugamento), com escasso infiltrado inflamatório crônico linfocítico. Coloração (HE) aumento 10X.	19
Figura 8	Microfotografia de peritônio de rato do subgrupo II (enxugamento da cavidade abdominal), com presença de corpo estranho e reação inflamatória intensa predominantemente linfocítica. Coloração (HE) aumento 10X.	20
Figura 9	Microfotografia de peritônio de rato do subgrupo I (controle nenhum tratamento), com intensa reação inflamatória com predomínio de linfócitos. Coloração (HE) aumento 4X.	21
Figura 10	Microfotografia de peritônio de rato do subgrupo III (lavagem da cavidade abdominal com soro fisiológico a 0,9% e enxugamento), com intenso infiltrado de plasmócitos. Coloração (HE) aumento 40X.	22
Figura 11	Microfotografia de pulmão de rato do subgrupo I (controle nenhum tratamento), com ocupação dos espaços alveolares por macrófagos e monócitos, hemorragia alveolar difusa e espessamento dos septos alveolares. Coloração (HE) aumento 4X.	23
Figura 12	Microfotografia de pulmão de rato do subgrupo I (controle nenhum tratamento), com intensa inflamação predominantemente linfocítica. Coloração (HE) aumento 4X.	24

Figura 13	Microfotografia de pulmão de rato do subgrupo II (enxugamento da cavidade abdominal), com exsudato linfohistioplasmocitário e neutrofilico. Coloração (HE) aumento 4X.	25
Figura 14	Microfotografia de pulmão de rato do subgrupo III (lavagem da cavidade abdominal com soro fisiológico 0,9% e enxugamento), com infiltrado linfocitário em disposição nodular peribronquiolar. Coloração (HE) aumento 10X.	26
Figura 15	Microfotografia de pulmão de rato do subgrupo IV (lavagem da cavidade abdominal com ropivacaína a 0,2% e enxugamento), dentro dos limites da normalidade. Coloração (HE) aumento 4X.	27
Figura 16	Microfotografia de pulmão de rato do subgrupo IV (lavagem da cavidade abdominal com ropivacaína a 0,2% e enxugamento), dentro dos limites da normalidade. Coloração (HE) aumento 40X.	28
Figura 17	Microfotografia de fígado de rato do subgrupo IV (lavagem da cavidade abdominal com ropivacaína a 0,2% e enxugamento), com arquitetura acinar preservada. Coloração (HE) aumento 40X.	29
Figura 18	Microfotografia de fígado de rato do subgrupo III (lavagem da cavidade abdominal com soro fisiológico a 0,9% e enxugamento), com espaço porta normal e com presença de pequenos linfócitos. Coloração (HE) aumento 10X.	30
Figura 19	Microfotografia de fígado de rato do subgrupo II (enxugamento da cavidade abdominal), com intensa inflamação predominantemente de mononucleares. Coloração (HE) aumento 4X.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estatísticas descritivas da resposta inflamatória (contagem celular) de Pulmões de ratos submetidos à peritonite fecal em campo de grande aumento (CGA 40X).	32
Tabela 2	Estatísticas descritivas da dosagem de TNF- α em ratos submetidos à peritonite fecal.	34
Tabela 3	Estatísticas descritivas da dosagem de IL-6 em ratos submetidos à peritonite fecal	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C5a	Sistema complemento
CBA	Citometric Bead Array
CGA	Campo de Grande Aumento
COEP CETEA	Comite de Ética e Pesquisa em Animais
Emescam	Escola Superior de Ciências da Santa Casa da Misericórdia de Vitória
EUA	Estados Unidos da América
FMLF -a	Nformil Lleucina metionil Lfenilalanin
HE	Hematoxilina eosina
HUCAM	Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes
IL	Interleucinas (1, 2, 3, 4, 6, 10, 11, 13)
LD ₅₀	Dose letal média
LPC	Ligadura e punção cecal
LPS	Lipopolissacarídeo
MCP	1 - Proteína químico atraente para monócitos
TNF α	Fator α (alfa) de necrose tumoral
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1- INTRODUÇÃO	1
2- OBJETIVO	3
3- REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1. Peritonite: Fisiopatologia	4
3.2. Peritonite: Lavagem Peritoneal	5
3.2.1. Lavagem com soluções-antissépticas	6
3.2.2. Lavagem peritoneal com antibióticos	6
3.2.3. Lavagem peritoneal com anestésicos locais	7
3.3. ANESTÉSICOS LOCAIS	7
3.3.1. Ação antimicrobiana	7
3.3.2. Ação anti-inflamatória.....	8
4- MÉTODO	10
5- TRATAMENTO ESTATÍSTICO	15
6- RESULTADOS	16
7- DISCUSSÃO	36
8- CONCLUSÃO	39
9- REFERÊNCIAS	40
10- ANEXOS	47

1. INTRODUÇÃO

A incidência da sepse assim com sua mortalidade aumentaram ao longo dos últimos anos. Nos Estados Unidos da América (EUA), estima-se uma incidência anual de 750.000 pacientes com sepse apresentando mortalidade de 28,6%, o que representa um custo de US\$ 16,7 bilhões em cuidados de saúde.¹ A peritonite é um processo inflamatório do peritônio sendo uma das causas mais importantes de sepse e óbito nas unidades cirúrgicas e de terapia intensiva.

A sepse associada à peritonite ocorre quando um foco infeccioso intra-abdominal desencadeia uma resposta inflamatória sistêmica. Esta resposta se caracteriza por ativação de diversos sistemas (complemento, coagulação, cininas e fibrinólise), células (endoteliais, leucócitos, monócitos, macrófagos e mastócitos) e liberação de mediadores (radicais livres de oxigênio, histamina, eicosanóides, fatores de coagulação e citocinas).^{2,3}

Quando uma infecção é capaz de liberar e ativar a cascata de eventos inflamatórios sistêmicos ela é chamada de sepse. Na sepse grave essa inflamação gera uma disfunção orgânica e quando surge uma hipotensão não responsiva a fluídos, está estabelecido o choque séptico⁴. Na maioria dos casos, a sepse é causada por um agente bacteriano, mas vírus, principalmente o da influenza A, e fungos também podem levar a tal situação⁵.

Após o reconhecimento do agente agressor, as células mononucleares desempenham o papel central na inflamação através da produção de citocinas pro-inflamatórias, mediadores lipídicos, fator tecidual, prostaglandinas, fator ativador de plaquetas e óxido nítrico⁶. A ativação da cascata do complemento gera o C5_a, capaz de aumentar a produção de citocinas na sepse.⁷

Quando não combatidas, essas citocinas levam a hipotensão refratária, enfraquecimento endotelial com edema grave e, por último, disfunção orgânica e morte.^{8,9} Dentre as citocinas pro-inflamatórias o fator alfa de necrose tumoral (TNF α) e as interleucinas 1 e 6 (IL-1, IL-6) atuam sinergicamente durante a inflamação.¹⁰⁻¹²

Além de ativarem os neutrófilos, linfócitos e células endoteliais vasculares, esses mediadores induzem a produção local de óxido nítrico¹³, prostaglandinas, proteínas de fase aguda manifestada clinicamente através da febre.¹⁴ A IL-6 está elevada na maioria dos pacientes com sepse grave e níveis elevados estão relacionados a eventos desfavoráveis no choque séptico.^{15,16}

O tratamento clássico das peritonites consiste na remoção mecânica dos contaminantes, restauração da integridade anatômica e administração sistêmica de antimicrobianos. O uso indiscriminado dos antibióticos contribuiu para o desenvolvimento de resistência em várias cepas de microorganismos. Nos EUA, em 1946, apenas 5% dos estafilococos eram resistentes a penicilina. Em 1949, 1950, 1959 a resistência a penicilina era descrita em 29, 50 e 80%, respectivamente, dos estafilococos isolados em hospitais americanos. No Brasil, atualmente, mais de 80% dos *S. aureus* isolados de pacientes hospitalizados e cerca de 70% dos isolados de pacientes da comunidade apresentam resistência às penicilinas naturais.¹⁷

A crescente incidência de resistência bacteriana associada a uma dificuldade no desenvolvimento de novos antibióticos direciona as pesquisas para a utilização de técnicas alternativas de tratamento da peritonite. Vários estudos têm investigado a modulação da resposta inflamatória visando aumentar a sobrevida e reduzir a mortalidade na sepse. Neste contexto, diversas publicações sugerem uma ampla gama de ações anti-inflamatórias dos anestésicos locais através de seus efeitos sobre as células do sistema imunológico, bem como plaquetas, eritrócitos e o próprio microorganismo¹⁸. De fato, estes agentes têm sido utilizados no tratamento de várias condições associadas a processos inflamatórios como: cistite intersticial, proctite ulcerativa, artrites, infecções herpéticas e queimaduras.¹⁹

O mecanismo de ação anti-inflamatório dos anestésicos locais não é totalmente compreendido, porém parece envolver uma interação reversível com as proteínas e lipídios da membrana, bem como regulação da atividade metabólica celular, migração, exocitose e fagocitose.¹⁹

A lidocaína e a bupivacaína já foram utilizadas experimentalmente em laboratório, em várias concentrações, e se mostraram eficazes contra algumas bactérias.²⁰

Até a presente data poucos estudos tem comprovado o efeito anti-inflamatório da ropivacaína, um enantiômero levógiro puro, pertencente ao grupo dos anestésicos locais amino-amidas e amplamente utilizado em anestesiologia.

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito da lavagem peritoneal com solução de ropivacaína 0,2% na sobrevivência, histopatologia de fragmentos de pulmão, fígado e peritônio, e resposta inflamatória de ratos com peritonite fecal experimental, produzida por fezes autógenas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PERITONITE: FISIOPATOLOGIA

A superfície peritoneal responde à lesão com reação inflamatória inespecífica, de forma idêntica a qualquer outra estrutura do organismo. A resposta peritoneal à agressão é comparável à resposta inflamatória sistêmica e utiliza os mesmos mecanismos de interação humoral e celular associada à exagerada produção local de citocinas pró-inflamatórias tais como o TNF α , IL-1, IL-2 e IL-6 e outras, além da liberação de histamina pelos mastócitos do peritônio, em quantidade que depende da gravidade da lesão e destruição da superfície mesotelial. Em geral, a produção de citocinas determina concentrações superiores aos níveis normais, com significado de gravidade que é inversamente proporcional à sobrevida.²¹⁻²³

O processo inflamatório ou infeccioso, então, que acomete, de forma localizada ou generalizada, a membrana-peritoneal é denominado peritonite. Os elementos causais são vários e o resultado final depende da intensidade da agressão, da persistência, do tipo de reação local e, principalmente, de fatores individuais. De fato, a peritonite, principalmente a generalizada, supurativa ou não, desencadeia um processo complexo de reações inflamatórias locais e sistêmicas cuja gravidade depende mais de fatores relacionados ao hospedeiro do que ao agente agressor.²⁴

A agressão intra-abdominal provoca uma sequência de respostas envolvendo a membrana peritoneal, os intestinos, os compartimentos dos líquidos orgânicos com subsequentes respostas cardiovasculares, respiratórias, renais, neuroendócrinas e metabólicas. As respostas cardiovasculares e respiratórias são as mais precoces.

A reação aos insultos orgânicos passa por duas fases diferentes e antagônicas que se equilibram ou se anulam e compõem duas síndromes, segundo a hipótese de Bone.^{25,26} A primeira é a síndrome da reação inflamatória sistêmica (fase pró-inflamatória), com produção de TNF α , IL-1 e IL-6, e a segunda é a síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória (fase anti-inflamatória) com liberação de substâncias anti-inflamatórias tais como IL-4, IL-10, IL-11, IL-13 que têm como finalidade restaurar a homeostase. É tido como certo que a gravidade da primeira fase contribui para o início e continuidade da sepse e que a segunda fase, reativa, tem papel na sua patogênese.²⁷

A alteração da dinâmica cardíaca, precocemente manifestada pelo aumento da frequência cardíaca e, depois, da respiratória (taquipnéia) são os detectores imediatos do

início da fase pró-inflamatória, quando as citocinas são liberadas. Se a agressão assume proporções indesejáveis ou surgem novos fatores desencadeadores de mais inflamação local, os mecanismos de compensação anti-inflamatório são despertados para a manutenção da homeostase. Há, de acordo com o postulado de Bone ²⁷, três circunstâncias em que o equilíbrio não ocorre:

1. quando a agressão é maciça,
2. quando há a concorrência de uma segunda lesão e
3. quando há produção local de quantidade excessiva ou escassa de um mediador.

Quando há o desequilíbrio, os mediadores pró-inflamatórios se espalham por via sistêmica e, se abundantes, aparecem os sinais clínicos da sepse²⁸. Níveis elevados de mediadores anti-inflamatórios, resposta significativa do organismo à primeira fase, provocam depressão imunológica. ²⁹⁻³³ Esse ciclo se retroalimenta ^{27,33,34} na tentativa de restabelecer a homeostase ou, se não, persistirá o quadro até a morte.

A redução da contaminação peritoneal, passo importante do tratamento, é feita com aspiração do conteúdo infectante, dos exsudatos purulentos, de restos alimentares ou partículas fecais, num esquema de debridamento radical ³⁵, seguida de lavagem da cavidade com soro fisiológico, ^{36,37-38} aquecido a 37 °C e cuidadosamente aspirado no final da limpeza.³⁹

3.2. PERITONITE: LAVAGEM PERITONEAL

Segundo Schein *et al.*,³⁸ a lavagem intraperitoneal na presença de peritonite purulenta com água esterilizada foi realizada por Joseph Price, um ginecologista, em 1905. Após seis anos, Torek reduziu a mortalidade por peritonite de 100% para 33%, por meio da lavagem peritoneal com soro fisiológico 0,9%. A lavagem peritoneal, no entanto, foi contestada por alguns cirurgiões, entre os quais Deaver, nos EUA, e Lord Moynihan, no Reino Unido.³⁸

Apesar de controverso, a lavagem da cavidade peritoneal para tratamento de peritonite com soluções contendo ou não substâncias adicionais é amplamente utilizado por cirurgiões e descrito em diversos estudos.⁴⁰

3.2.1. Lavagem peritoneal com soluções antissépticas

O uso de antissépticos é uma possibilidade terapêutica por causa do aumento da resistência bacteriana aos antibióticos. Uma comparação entre cinco antissépticos (taurolin 2%, iodopovidine 2%, noxitiolina a 1% e 2%, hipoclorito a 2%, clorexidine a 0,02% e 0,05%) no tratamento de peritonite em camundongos induzida com injeção intraperitoneal de 10 vezes a dose letal média (LD_{50}) de *Escherichia coli*, demonstrou que apenas a clorexidine a 0,02% e a 0,05% foi eficaz e reduziu a mortalidade para 14% e 50%, respectivamente. Entretanto quando foi administrado uma hora após a indução da peritonite, esse antisséptico não foi tão eficaz, demonstrando a importância do início do tratamento.⁴¹

Demonstrou-se em ratos a ineficácia e uma possível toxicidade com o uso de iodopovidine e noxitiolina a 2,5% na lavagem peritoneal após a indução de peritonite fecal com inoculação de bactérias.⁴²

3.2.2. Lavagem peritoneal com antibióticos

O uso de antibiótico por 16 a 36 horas em 14 pacientes (2 g de ampicilina em dois pacientes e 10 milhões de unidades de penicilina e 1 g de kanamicina em 12 pacientes), na lavagem peritoneal contínua em peritonites generalizadas de origem ginecológica, mostrou-se útil, eficaz e seguro.⁴³

Após a indução de peritonite em ratos, avaliou-se a sobrevida e formação de aderências com a realização de lavagem peritoneal com soro fisiológico ou rifampicina em duas doses (15 ou 12,5 mg/kg). O experimento demonstrou que a terapia com rifampicina reduziu a mortalidade e a quantidade de aderências.⁴⁴

Estudo experimental demonstrou que a lavagem peritoneal com soro fisiológico e a instilação tópica de gentamicina e clindamicina foi mais eficaz na diminuição da mortalidade que a lavagem com soro fisiológico isolada na peritonite em ratos provocada por fezes do próprio animal.⁴⁵

Uma recente meta-análise envolvendo a eficácia da lavagem peritoneal em modelos experimentais de peritonite demonstrou uma redução da mortalidade nos estudos que utilizaram antibióticos associados à lavagem peritoneal.⁴⁶

3.2.3. Lavagem peritoneal com anestésicos locais

Comparado a soro fisiológico, a lidocaína a 1% e a bupivacaína a 0,5%, se mostraram eficazes na prevenção da peritonite induzida por ácido clorídrico 0,1 M.⁴⁷

Camundongos com peritonite séptica induzida segundo modelo experimental, tratados com lidocaína a 5% e a 10% e com bupivacaína a 1% e a 2% por via subcutânea, em bomba de infusão, apresentaram diminuição da mortalidade e proteção contra disfunções hepáticas e renais ao atenuar a resposta inflamatória.⁴⁸

Ratos tratados com lidocaína 2% e bupivacaína 0,5% diluídas em soro fisiológico 0,9%, apresentaram 100% de sobrevivência em modelo experimental de peritonite séptica induzida com fezes autógenas.^{49,50}

3.3. ANESTÉSICOS LOCAIS

Além da ação anti-inflamatória, diversos estudos demonstraram o efeito antimicrobiano dos anestésicos locais.^{20, 51, 52, 53}

3.3.1. Ação antimicrobiana

Foram estudados os efeitos da ação dos anestésicos locais sobre a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e a *Candida albicans*. A ropivacaína não inibiu nenhum destes microorganismos. A bupivacaína a 0,5% e a 0,25%, a lidocaína a 5% e 2% e a prilocaína a 2% reduziram a viabilidade das colônias dos microorganismos testados. A prilocaína a 1% reduziu a viabilidade da *Escherichia coli*, do *Staphylococcus aureus* e da *Pseudomonas aeruginosa*. A lidocaína a 1% reduziu apenas a viabilidade da *Pseudomonas aeruginosa*, e a prilocaína 0,5% reduziu apenas a da *Escherichia coli*.²⁰

A lavagem brônquica com lidocaína reduziu o crescimento do *Streptococcus pneumoniae* de modo mais eficaz que o soro fisiológico. Entretanto, soro fisiológico normal reduziu o crescimento da *Moxarella catarrhalis*, quando comparada à lidocaína. Finalmente, as duas soluções não tiveram efeito sobre o *Haemophilus influenzae*, a *Pseudomonas aeruginosa* e a *Candida albicans*.⁵¹

A lidocaína (1%, 2% e 4%), com ou sem adrenalina, foi testada em cepas isoladas de bactérias comumente encontradas em feridas hospitalares como: *Enterococcus faecalis*,

Escherichia coli, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e, em cepas resistentes a meticilina e vancomicina de *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus*. A lidocaína inibiu de forma dose dependente o crescimento das cepas das bactérias testadas. A grande sensibilidade à lidocaína foi mostrada contra organismos Gram negativos. A menor sensibilidade à lidocaína foi contra o *Staphylococcus aureus*. A adição de adrenalina não alterou a sensibilidade de bactérias à lidocaína.⁵²

Avaliou-se os efeitos antimicrobianos dos anestésicos, *in vivo e in vitro*, por meio de uma revisão de literatura desde 1950 em um banco de dados. Concluiu-se que os anestésicos locais possuem propriedades antimicrobianas contra um amplo espectro de patógenos. Vários anestésicos em concentrações semelhantes às utilizadas na prática clínica inibem o crescimento de inúmeras bactérias e fungos. Demonstraram que a bupivacaína e a lidocaína possuem um espectro maior do que a da ropivacaína. O maior tempo de exposição e a maior concentração correlacionam-se com o aumento proporcional da atividade antibacteriana dos anestésicos.⁵³

3.3.2. Ação anti-inflamatória

Analisou-se o efeito da ropivacaína, *in vivo*, na interação do leucócito com o endotélio, induzido por inoculação de TNF- α na microcirculação do cremaster de ratos. Concluíram que a ropivacaína reduziu a adesão leucocitária e o recrutamento tissular dos leucócitos, podendo ser útil no controle farmacológico da resposta inflamatória aguda.⁵⁴

Através de estudos com células *in vitro*, analisou-se os efeitos anti-inflamatórios dos anestésicos locais. Demonstraram que a ropivacaína e lidocaína inibiram a proliferação de fibroblasto. A ropivacaína e bupivacaína inibem a agregação plaquetária induzida por epinefrina.⁵⁵

A lidocaína e bupivacaína diminuem os níveis plasmáticos de TNF- α indicando que os anestésicos locais exercem ação anti-inflamatória em peritonite induzida por ligadura e punção do ceco e tratadas com anestésicos locais por via subcutânea.⁴⁸ Avaliou-se o efeito de diferentes doses de lidocaína na estimulação de monócitos humanos com lipopolissacarídeo (LPS), e os efeitos da estimulação e secreção de uma proteína quimio atracente para monócitos (MCP-1). O resultado foi que a lidocaína modula a produção de MCP-1 e suprime seus efeitos quimiotáticos.⁵⁶

Os efeitos anti-inflamatórios da lidocaína na prevenção da lesão hiperóxica nos pulmões de ratos foram avaliados com as dosagens laboratoriais de leucócitos, citocinas (TNF- α e IL-1 β), albumina e proteínas do complemento no lavado broncoalveolar. Com a redução dos fatores analisados, demonstrou-se que a lidocaína exerce efeito profilático na resposta inflamatória da lesão pulmonar hiperóxica.⁵⁷

Estudo experimental em pulmões isolados de ratos analisou a resposta anti-inflamatória da lidocaína e mepivacaína. A ativação dos polimorfonucleares era induzida com um análogo de peptídeos de membrana de bactérias (N-formil-L-leucina-metionil-L-fenilalanina – FMLF). O tratamento prévio com os anestésicos locais reduziu as lesões histológicas, como a alveolite granulocítica e apresentou menores valores de pressão de artéria pulmonar.⁵⁸

Avaliando-se o efeito do pré-condicionamento pulmonar com lidocaína, venosa e inalatória, em ratos com endotoxemia induzida pela injeção de LPS, observou-se a redução significativa na concentração de TNF- α e IL-1 β no lavado broncoalveolar mas não no plasma.

4. MÉTODO

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), de acordo com o protocolo 028/09 (COEP-CETEA), foram operados 36 ratos Wistar machos, pesando entre 280 e 320 g, provenientes do Biotério do Centro de Pesquisa da Emescam (Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, Espírito Santo), divididos em dois grupos distintos de 20 (Grupo A) e 16 (Grupo B) ratos, distribuídos, aleatoriamente, por sorteio em quatro subgrupos com cinco e quatro animais cada.

No grupo A avaliou-se a sobrevivência dos animais e a histopatologia do pulmão, peritônio e fígado. No grupo B realizou-se as dosagens de marcadores inflamatórios IL-6 e TNF- α , por meio da coleta de 1 mL de sangue através de punção cardíaca com agulha 25G \times 5,5.

Estes animais foram mantidos em condições ambientais constantes e, aclimatizados por um período de 7 dias antes de se iniciar o experimento, em gaiolas com cinco animais cada e alimentados com dieta apropriada (Nuvital[®]) e água *ad libitum*.

Os animais foram anestesiados pela injeção de cloridrato de S(+) cetamina (Cristália[®], São Paulo, Brasil), na dose de 10 mg/kg de peso do animal, no músculo da face anterior da coxa direita, para serem submetidos a uma punção abdominal com cateter de teflon 16G no quadrante inferior esquerdo do abdome. A seguir foi injetada, na cavidade abdominal, uma suspensão de fezes autógenas, recém-defecadas, preparada com 2 g de fezes diluída em 17 mL de soro fisiológico (Figura 1). Antes da injeção filtrou-se a suspensão em uma gaze para permitir a sua livre passagem pelo interior da agulha. Dessa suspensão foi injetada 10 mL/kg de peso do animal na cavidade abdominal.⁶⁰



Figura 1 - Punção abdominal em rato para inoculação de suspensão de fezes e solução salina.

Seis horas após a indução da peritonite, os ratos foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de xilazina 10 mg/kg (Lab. König. SA[®], Argentina) e cloridrato de S(+) cetamina 50 mg/kg (Cristália[®], São Paulo, Brasil) e submetidos à laparotomia mediana, com incisão de aproximadamente 2 cm de comprimento, e exame da cavidade abdominal, para a comprovação da peritonite e procedimento por subgrupo (Figura 2).

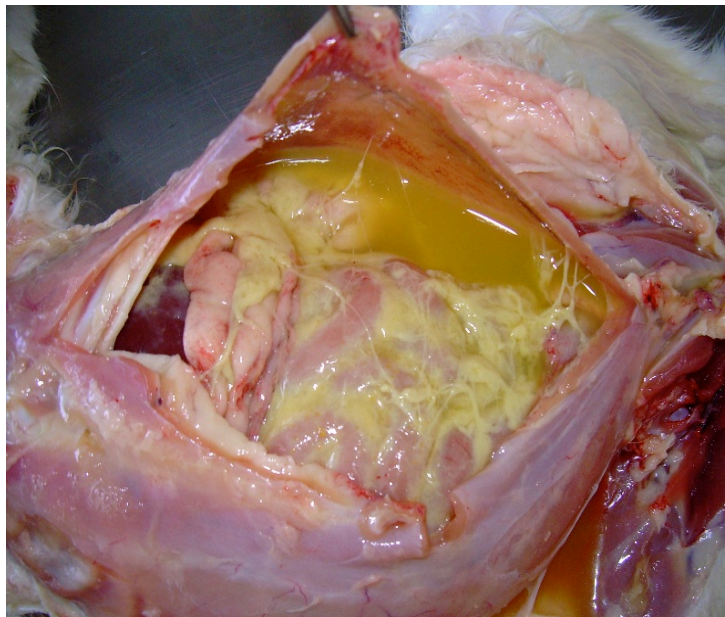


Figura 2 - Peritonite purulenta em rato 6 horas após a inoculação de fezes autógenas.

Os animais de ambos os grupos foram distribuídos aleatoriamente em quatro subgrupos de cinco animais no grupo A e de quatro animais no grupo B: Subgrupo I- Controle: nenhum tratamento; Subgrupo II- Enxugamento suave do conteúdo da cavidade abdominal com gaze seca; Subgrupo III- Lavagem da cavidade abdominal com 3 mL de soro fisiológico 0,9% e enxugamento; Subgrupo IV- Lavagem da cavidade abdominal com 3 mL de ropivacaína 0,2% e enxugamento. Nos Subgrupos III e IV, foi injetada na cavidade soro fisiológico (Subgrupo 3), ou ropivacaína 0,2% (Cristália[®], São Paulo, Brasil) (Subgrupo 4), e aí deixada por três minutos. Nesse período a solução foi manipulada cuidadosamente entre as vísceras abdominais para permitir um maior contato com o peritônio. Após esse procedimento enxugou-se o líquido peritoneal suavemente com gaze seca para retirar a maior quantidade possível do líquido. A parede abdominal foi suturada em plano único com pontos separados utilizando fio mononylon (4-0). Todos os animais foram acondicionados em gaiolas, alimentados com dieta apropriada (Nuvital[®]) e água *ad libitum*. A hidratação foi realizada com a injeção de 5 mL de soro fisiológico 0,9%, por via subcutânea, a cada 24 horas, durante dois dias⁶¹. Na analgesia utilizou-se cloridrato de nalbufina, 0,3 mg/kg de peso do animal, por via subcutânea, de 8 em 8 horas, durante dois dias.

Os animais do grupo A que morreram foram necropsiados e anotados os horários dos óbitos. Os animais sobreviventes foram eutanasiados no 11^o dia do pós-operatório com pentobarbital (Cristália[®], São Paulo, Brasil) na dose de 50 mg/kg de peso do animal via intramuscular, para necropsia. Retirou-se fragmentos do fígado, pulmões e do peritônio dos animais que foram a óbito e dos eutanasiados para estudo histopatológico. O material colhido foi fixado em formaldeído a 10% e armazenado em um volume de solução de 10 vezes o volume da peça. Processado em autotécnico da marca Lupe[®], 11 banhos e, emblocados em blocos de parafina e cortados em micrótomo (SLE[®]) à 2,5 micra. O material foi corado em hematoxilina e eosina.

No grupo B, seis horas após a intervenção cirúrgica, foi coletada amostras de sangue (1 mL) de cada animal, de todos os subgrupos, por punção cardíaca com agulha 25G X 5,5, para avaliar os níveis de IL-6 e TNF- α . Após a coleta sanguínea todos os animais foram eutanasiados com pentobarbital (Cristália[®], São Paulo, Brasil) na dose de 50 mg/kg de peso do animal via intramuscular. Estas amostras sanguíneas coletadas foram centrifugadas para separação do plasma, congeladas e transportadas em recipiente fechado contendo gelo seco.

A análise das citocinas foi realizada pelo método *Citometric Bead Array* (CBA) (Figura 3) no Centro de Pesquisa René Rachou – Fiocruz, Belo Horizonte. Neste sistema, os

níveis dos analitos avaliados foram quantificados utilizando o kit *BD Pharmingen's CBA* que emprega uma mistura de esferas de poliestireno, de intensidades de fluorescência discretas e distintas, recobertas com anticorpos específicos para os analitos de interesse, que são detectados nos canais FL3/FL4 da citometria de fluxo. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de até vinte analitos em um mesmo ensaio, empregando-se um pequeno volume de amostra.

Neste estudo, a metodologia de CBA foi adaptada do protocolo original proposto pelo fabricante, com algumas modificações: alíquotas de 25 μ L de plasma foram utilizadas sem diluição prévia. Alíquotas de 25 μ L dos padrões de citocinas e quimiocinas foram submetidas à diluição seriada com diluente G (solução diluente tamponada), "Padrão sem diluição" – 5000 pg/mL, 1:2 – 2500 pg/mL, 1:4 – 1250 pg/mL, 1:8 – 625 pg/mL, 1:16 – 312,5 pg/mL, 1:32 – 156 pg/mL, 1:64 – 80 pg/mL, 1:128 – 40 pg/mL e 1:256 – 20 pg/mL e 25 μ L de diluente G apenas (controle negativo). As amostras e os padrões foram transferidos para tubos de poliestireno de 5 mL. A cada tubo foi adicionado 15 μ L da mistura de esferas de captura, conjugadas com anticorpos monoclonais anti-citocinas e quimiocinas, IL-12p70, TNF- α , IL-10, IL-6, IL-1 β , CXCL-8 (Human Inflammation Kit, BD, Pharmingen, E.U.A.) e GM-CSF, CCL24, G-CSF, IL-4, IL-3 (Human Allergy Mediators Kit II, BD, Pharmingen, E.U.A.) mais 18 μ L do coquetel de anticorpos monoclonais anti-citocinas e quimiocinas, conjugados com ficoeritrina - PE (reagente B) e incubados por 3 horas, a temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após a incubação, as esferas de captura foram lavadas com 500 μ L da solução F (Tampão fosfato salínico) e centrifugadas a 340 g, por 7 minutos a 18°C. O sobrenadante foi cuidadosamente descartado e os dados imediatamente adquiridos e analisados no citômetro de fluxo (FACScalibur, BD, E.U.A.).

Após as etapas de marcação, um total de 1.800 eventos/região (R1) foi obtido com base na seleção da população de microesferas em gráficos de densidade de tamanho versus granulosidade. Selecionada a população de interesse, para a análise dos dados, as microesferas foram separadas em gráficos de densidade FL3 x FL2, onde as seis esferas com intensidades de fluorescência distintas ocuparam posições específicas ao longo do eixo Y (FL3). A análise do deslocamento das esferas ao longo do eixo X (FL2) foi empregada como variável proporcional à concentração de cada analito presente na amostra.

Para a obtenção dos resultados da análise quantitativa dos analitos uma curva padrão foi construída, baseada nos dados dos padrões de citocinas em concentrações de 20 pg/mL a 5.000 pg/mL. Um modelo de ajustamento, por meio da construção da curva do 4º parâmetro

logístico, que permite o ajuste da melhor curva não linear para dados detectáveis, foi utilizado. Dessa forma, foi possível extrapolar valores de intensidades de fluorescência de amostras fora dos limites da curva padrão. Os resultados foram expressos em pg/mL.

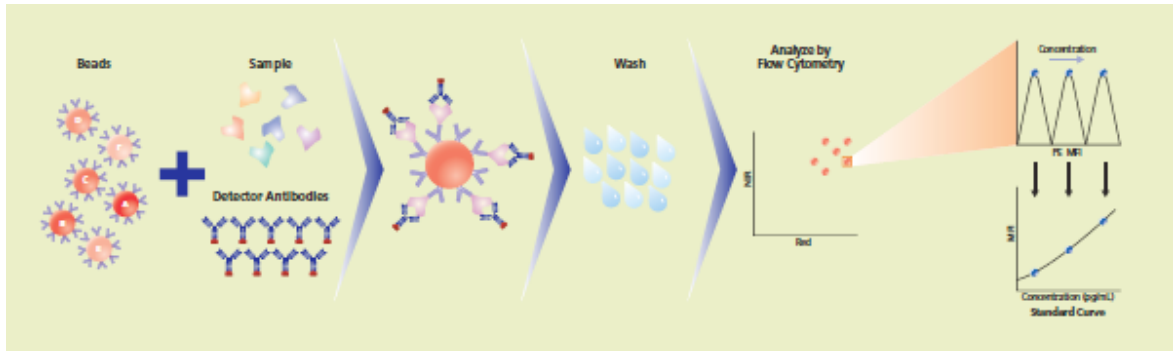


Figura 3 - Ilustração do método de Citometria de Fluxo

5. TRATAMENTO ESTATÍSTICO

O cálculo amostral utilizado nos experimentos de dosagem das citocinas foi baseado em estudo prévio que demonstrou uma diferença de 40 pg/mL com um desvio padrão de 15 pg/mL na dosagem de IL-6 entre os animais, com significância de 5% e poder de teste de 95%. Com estes parâmetros foi obtido um valor de amostra de 4 animais.⁶²

No grupo A, para analisar as curvas de sobrevida entre os quatro subgrupos de animais submetidos à peritonite fecal foi utilizada a curva de sobrevida de “Kaplan Méier”.

No grupo “B” os valores de IL-6 e TNF- α dos 4 subgrupos foram comparados utilizando-se o teste não paramétrico de T. Mann-Whitney, por ser a amostra pequena (n=4) e as comparações utilizando um grupo fixo (Ropivacaína).

Foi utilizado o software IBM SPSS Statistics 19 (Statistical Package for the Social Sciences) para análise dos dados.

6. RESULTADOS

6.1 GRUPO A

6.1.1 Sobrevida

A figura 4 mostra que a sobrevida dos animais onde se realizou lavagem peritoneal foi superior aos subgrupos controle e enxugamento. A curva de sobrevida mostrou uma mortalidade de 100% com 12 horas para os animais do subgrupo I e 16 horas para o subgrupo II. O subgrupo III apresentou 60% de mortalidade com 24 horas. A lavagem com ropivacaína impediu o óbito até o ultimo dia de acompanhamento em todos os animais desse subgrupo.

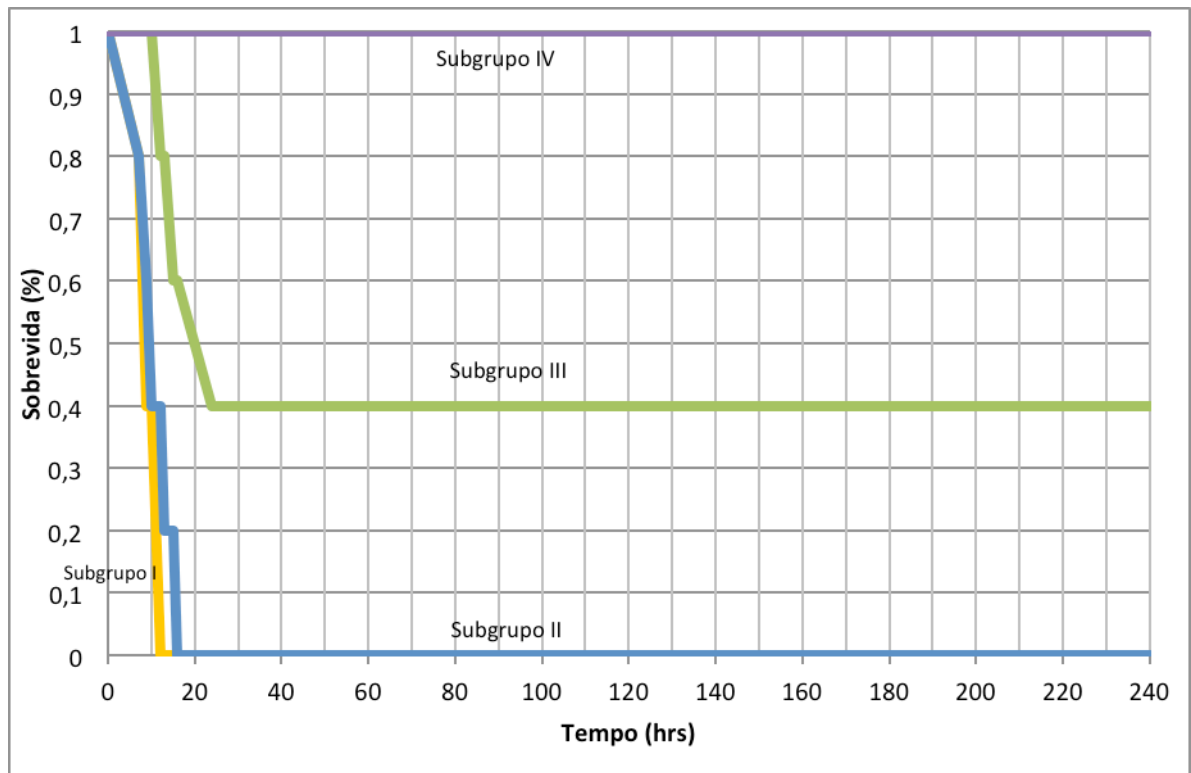


Figura 4 - Curva de sobrevida entre subgrupos I, II, III, IV.

6.1.2 Histopatológico

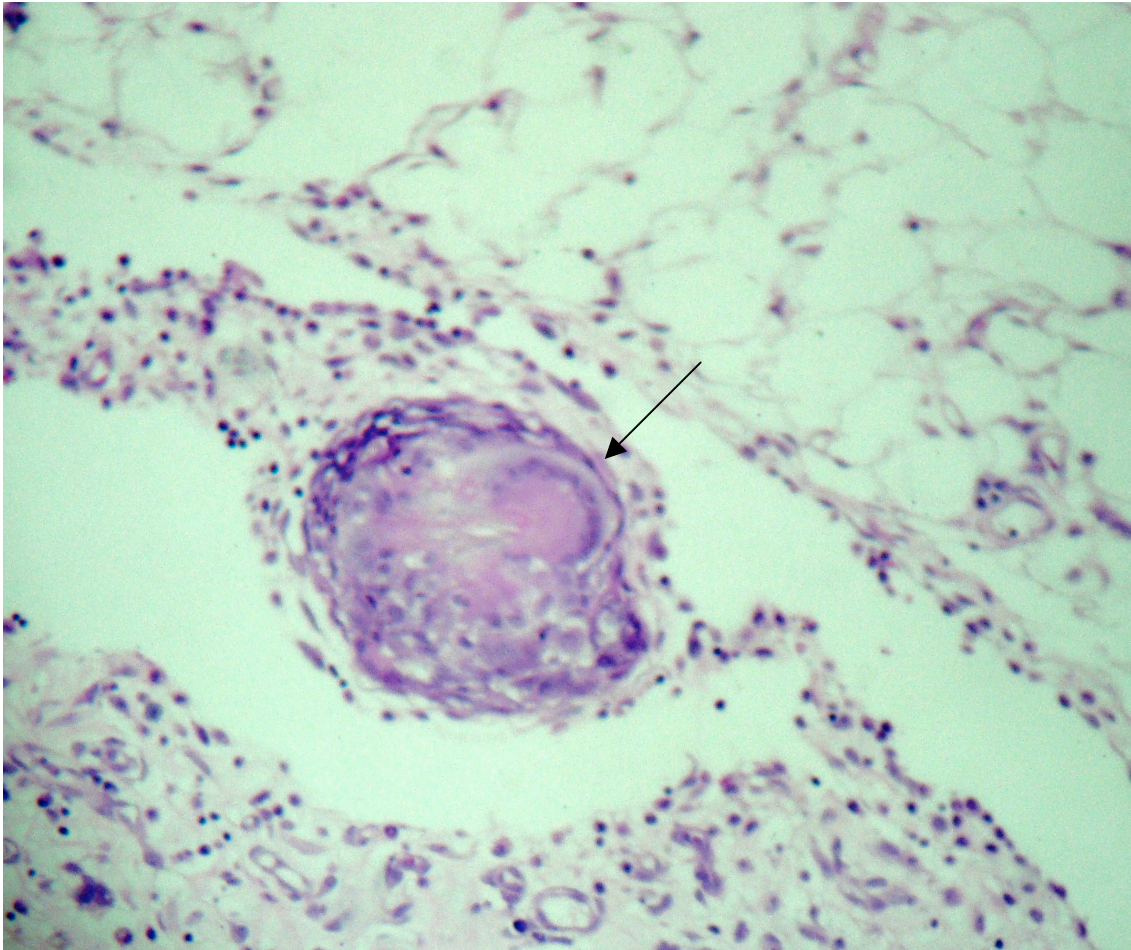


Figura 5 - Microfotografia de peritônio de rato do subgrupo III (lavagem da cavidade abdominal com soro fisiológico 0,9% e enxugamento), com inflamação granulomatosa do tipo corpo estranho (seta).

Coloração (HE) aumento 10X

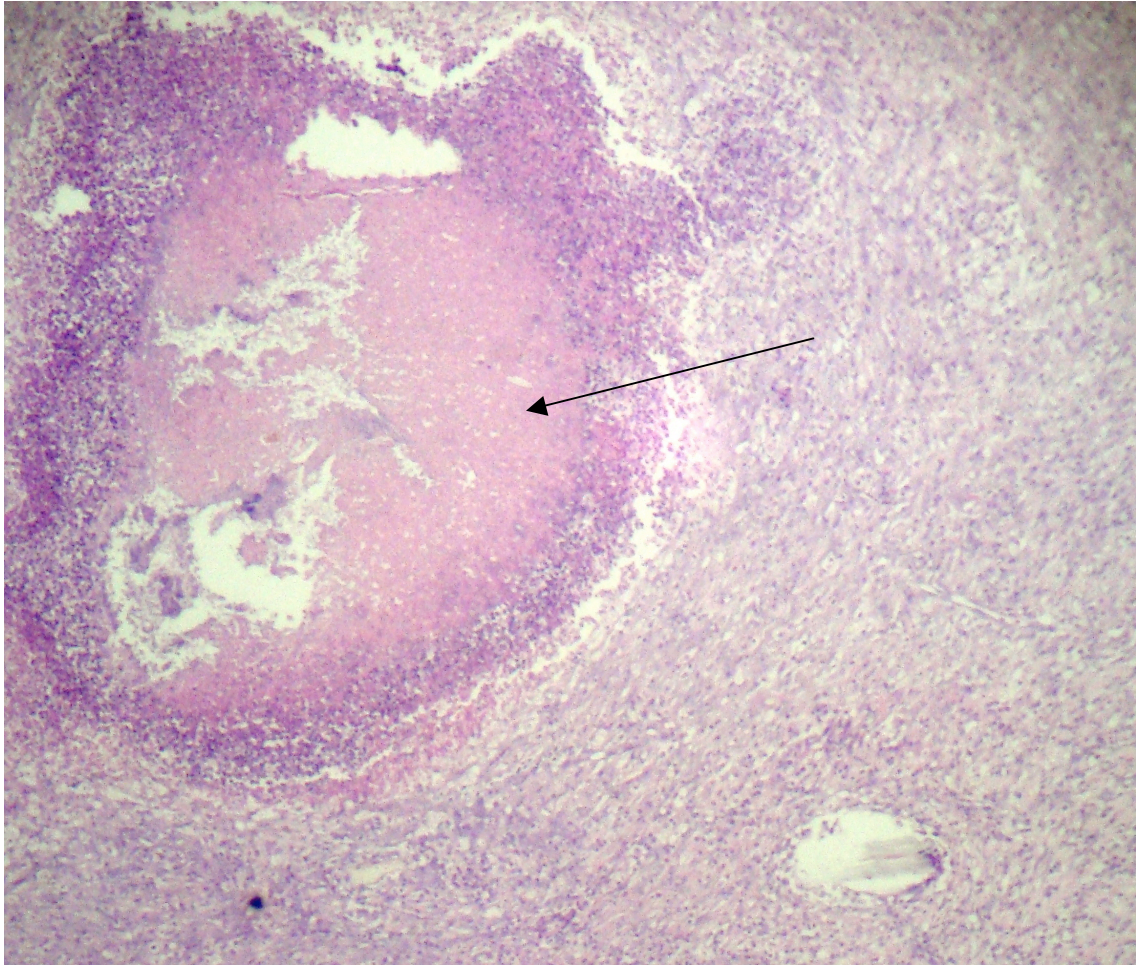


Figura 6 - Microfotografia de peritônio de rato do subgrupo III (lavagem da cavidade abdominal com soro fisiológico a 0,9% e enxugamento), com inflamação crônica e áreas de necrose central (seta).
Coloração (HE) aumento 4X

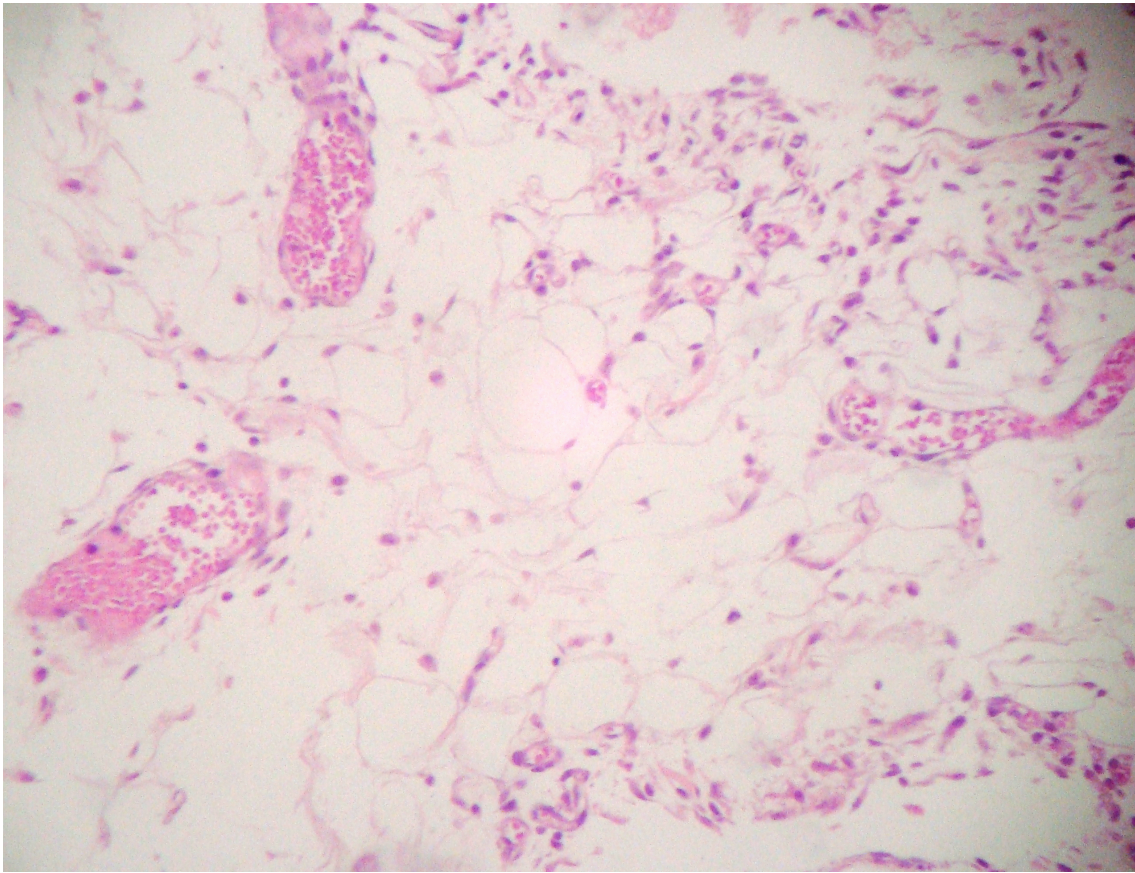


Figura 7 - Microfotografia de peritônio de rato do subgrupo IV (lavagem da cavidade abdominal com ropivacaína a 0,2% e enxugamento), com escasso infiltrado inflamatório crônico linfocítico.

Coloração (HE) aumento 10X

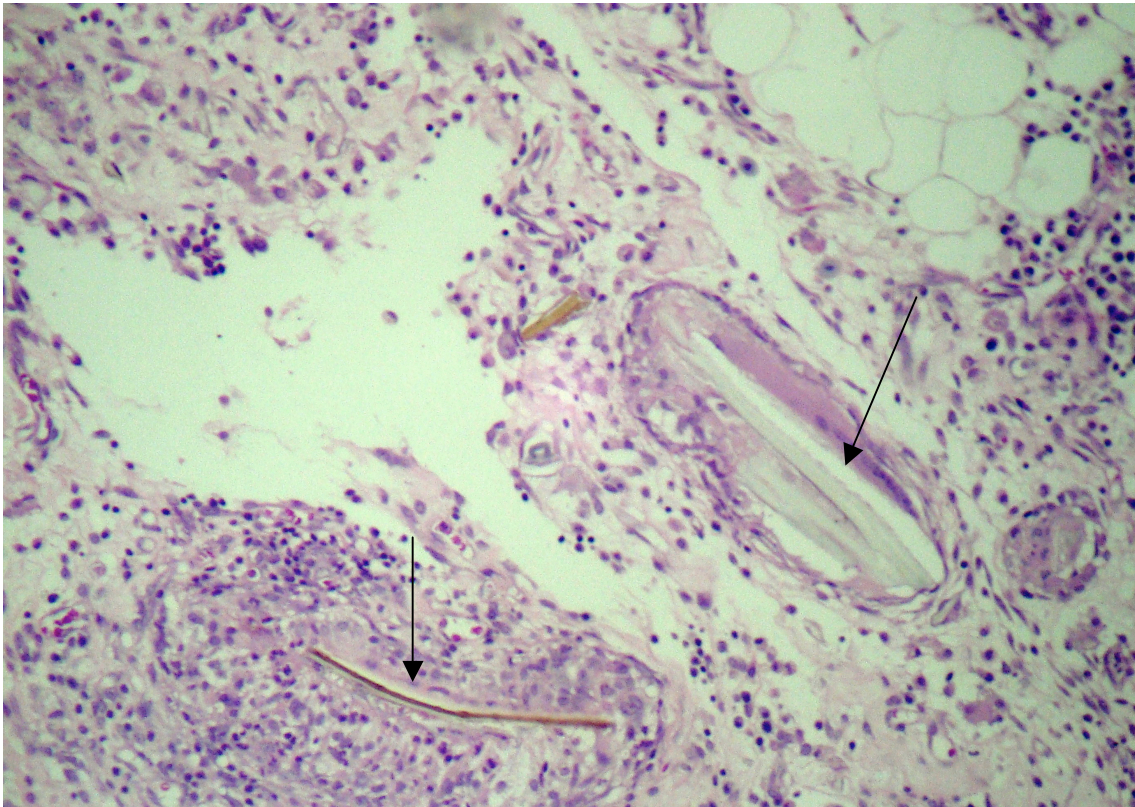


Figura 8 - Microfotografia de peritônio de rato do subgrupo II (enxugamento da cavidade abdominal), com presença de corpo estranho (seta) e reação inflamatória intensa predominantemente linfocítica.
Coloração (HE) aumento 10X

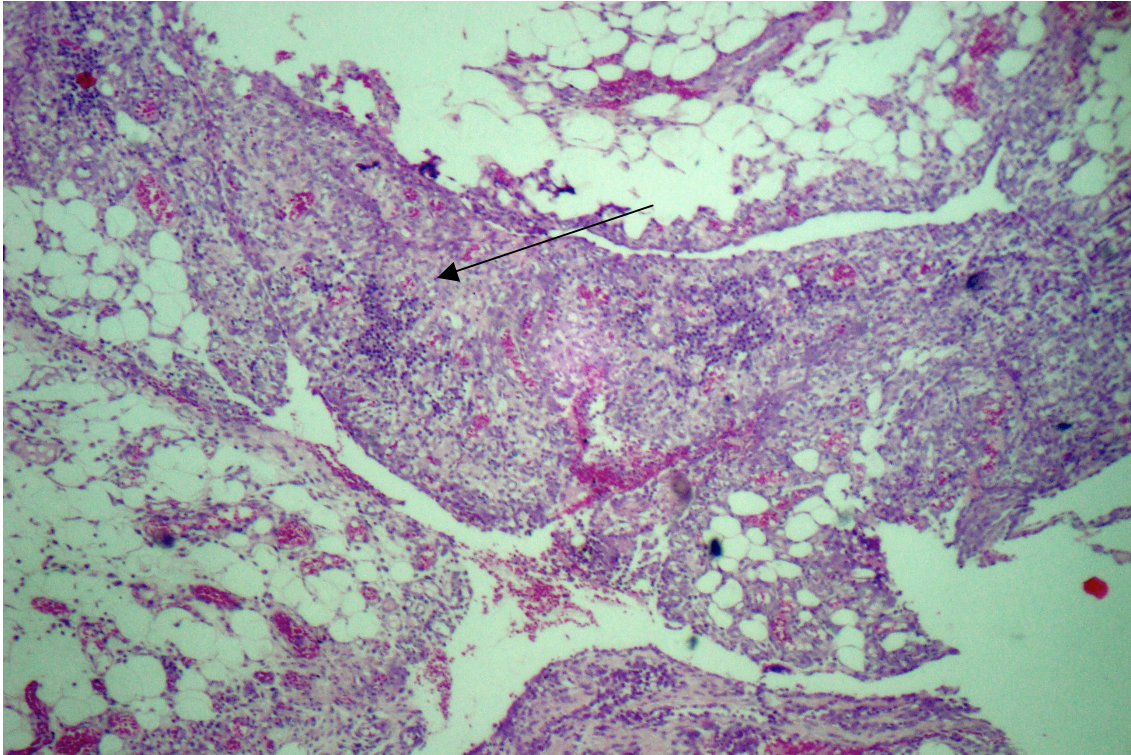


Figura 9 - Microfotografia de peritônio de rato do subgrupo I (controle nenhum tratamento), com intensa reação inflamatória com predomínio de linfócitos (seta). Coloração (HE) aumento 4X

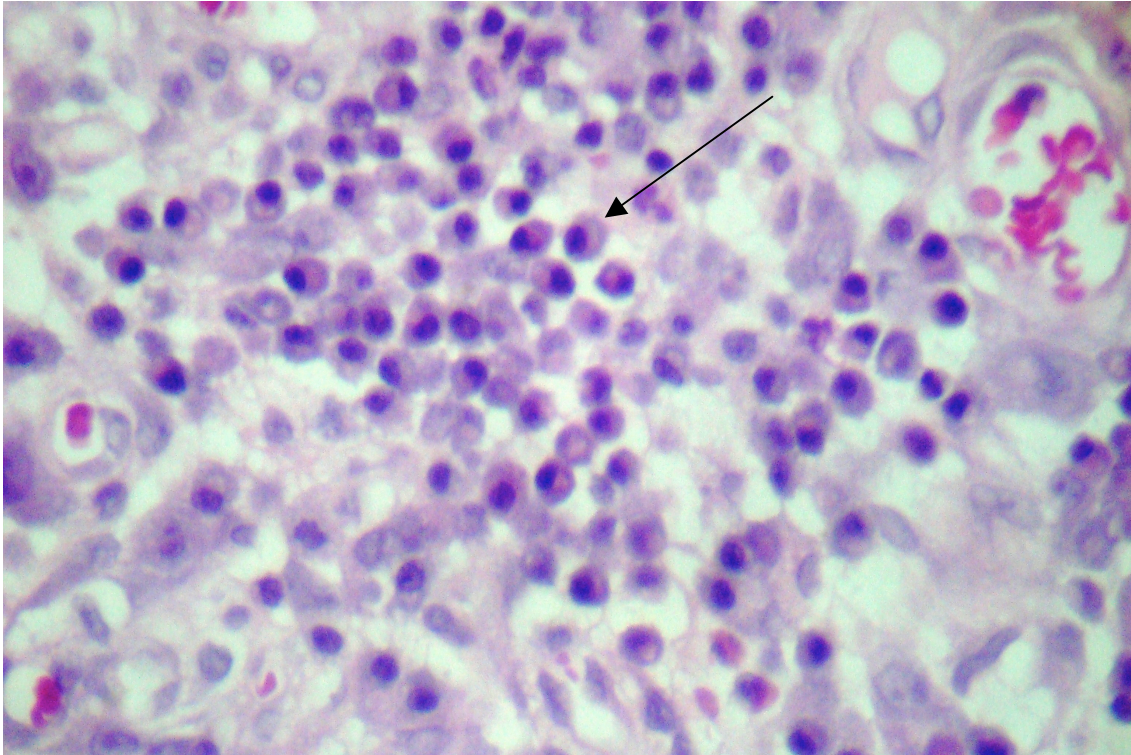


Figura 10 - Microfotografia de peritônio de rato do subgrupo III (lavagem da cavidade abdominal com soro fisiológico a 0,9% e enxugamento), com intenso infiltrado de plasmócitos (seta).
Coloração (HE) aumento 4X

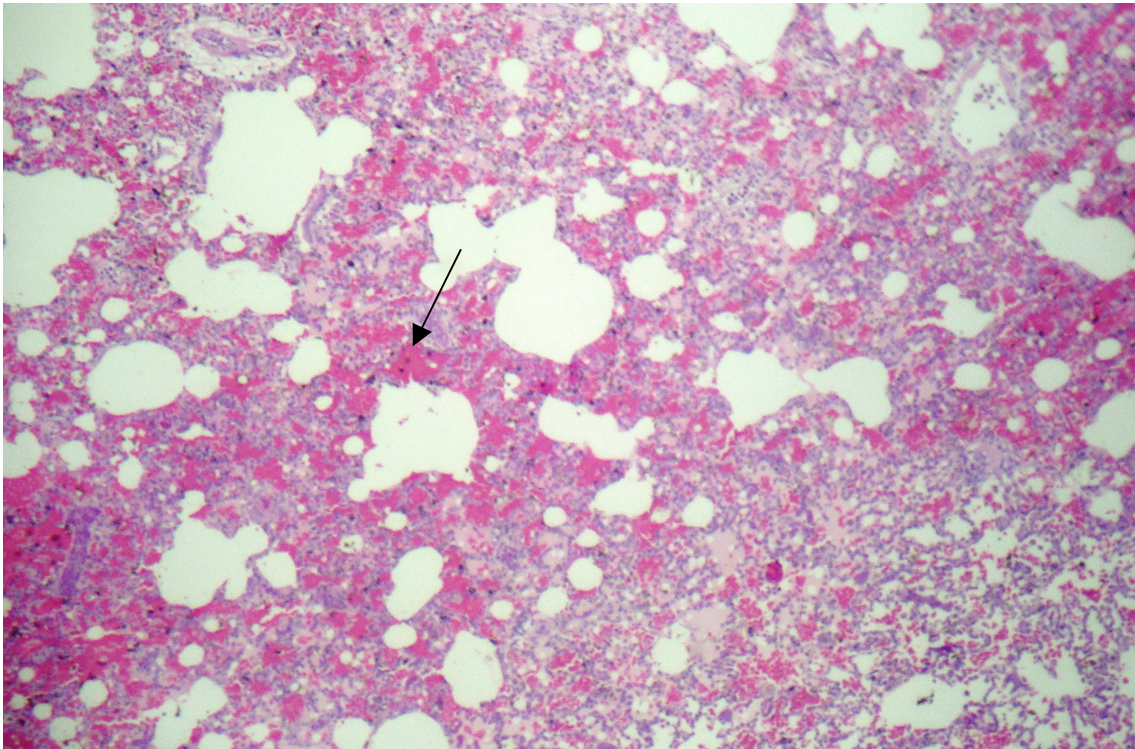


Figura 11 - Microfotografia de pulmão de rato do subgrupo I (controle nenhum tratamento), com ocupação dos espaços alveolares por macrófagos e monócitos, hemorragia alveolar difusa (seta) e espessamento dos septos alveolares. Coloração (HE) aumento 4X

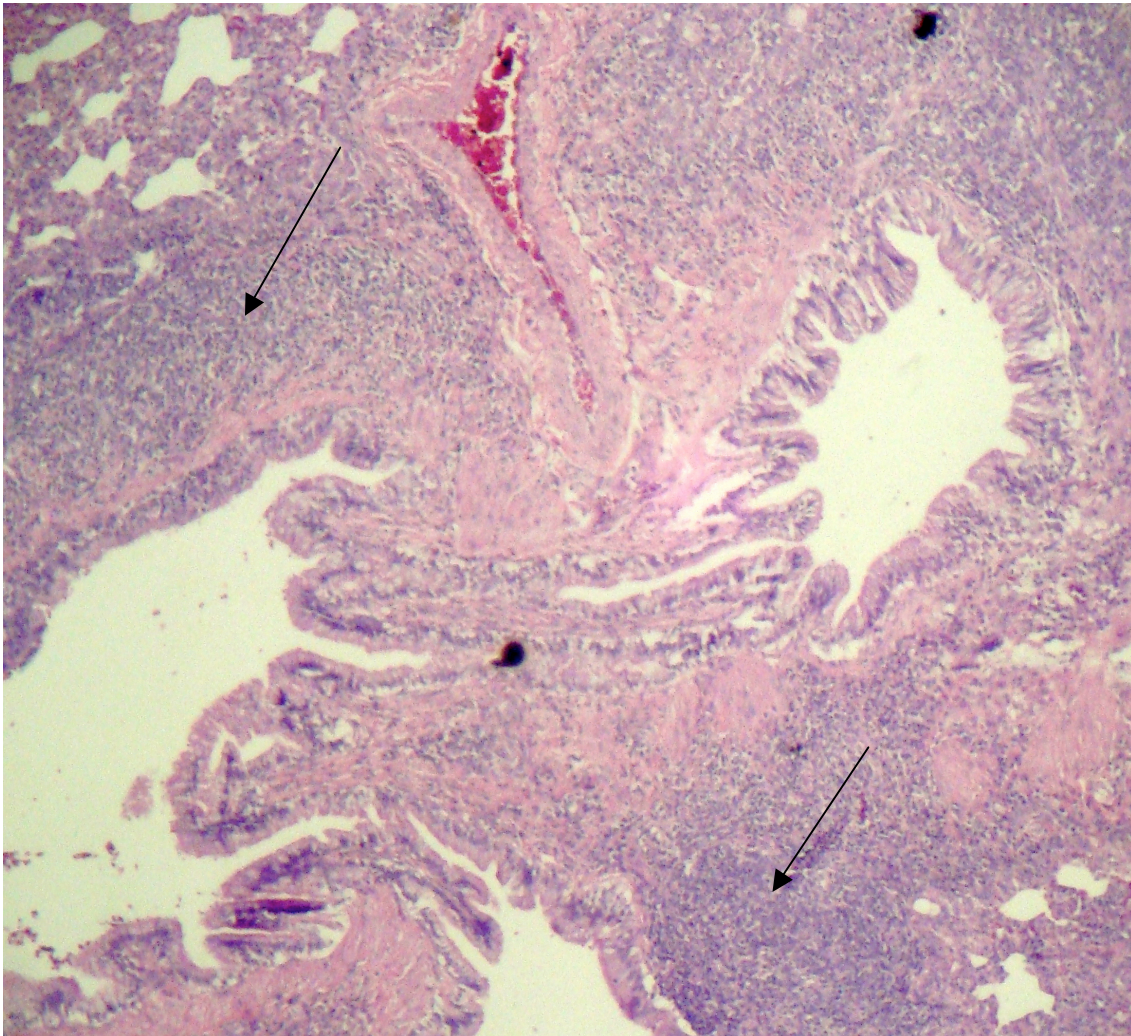


Figura 12 - Microfotografia de pulmão de rato do subgrupo I (controle nenhum tratamento), com intensa inflamação predominantemente linfocítica (seta).
Coloração (HE) aumento 4X

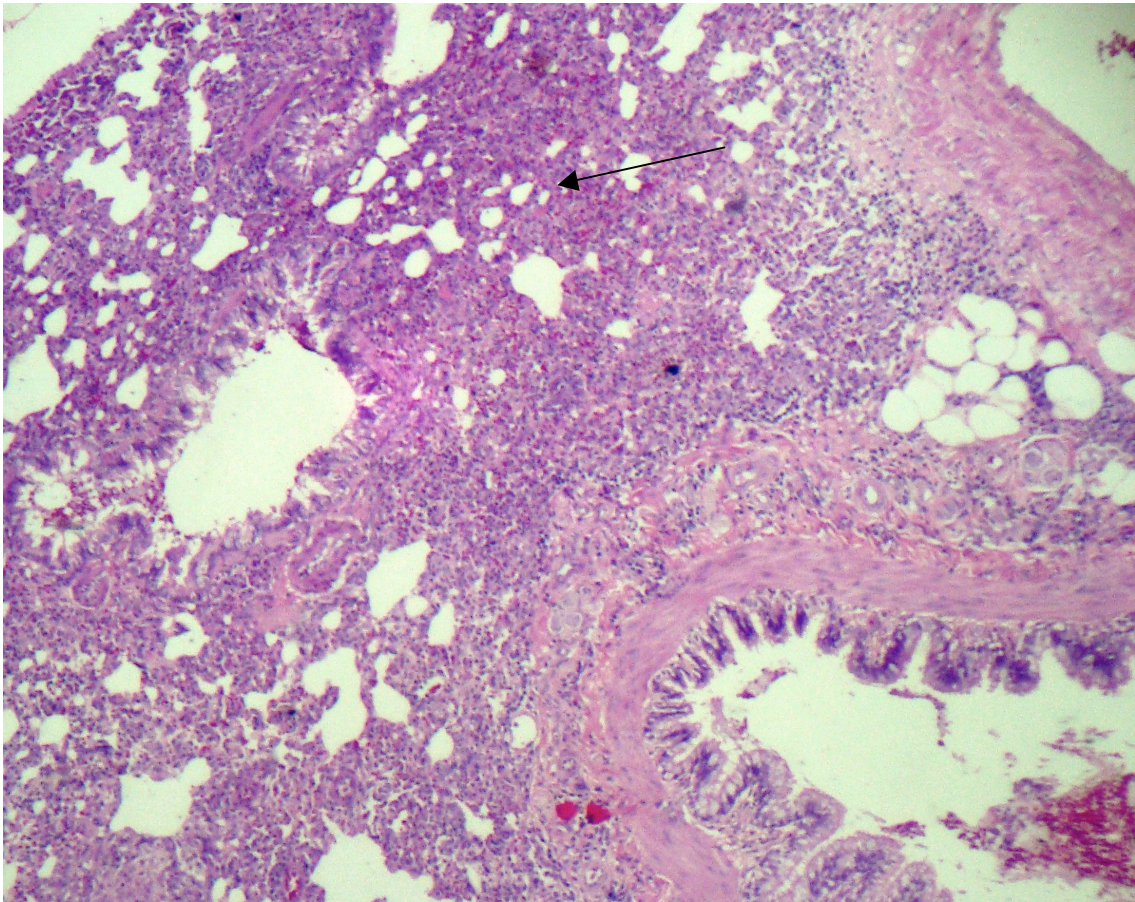


Figura 13 - Microfotografia de pulmão de rato do subgrupo II (enxugamento da cavidade abdominal), com exsudato linfohistioplasmocitário e neutrofílico (seta).
Coloração (HE) aumento 4X

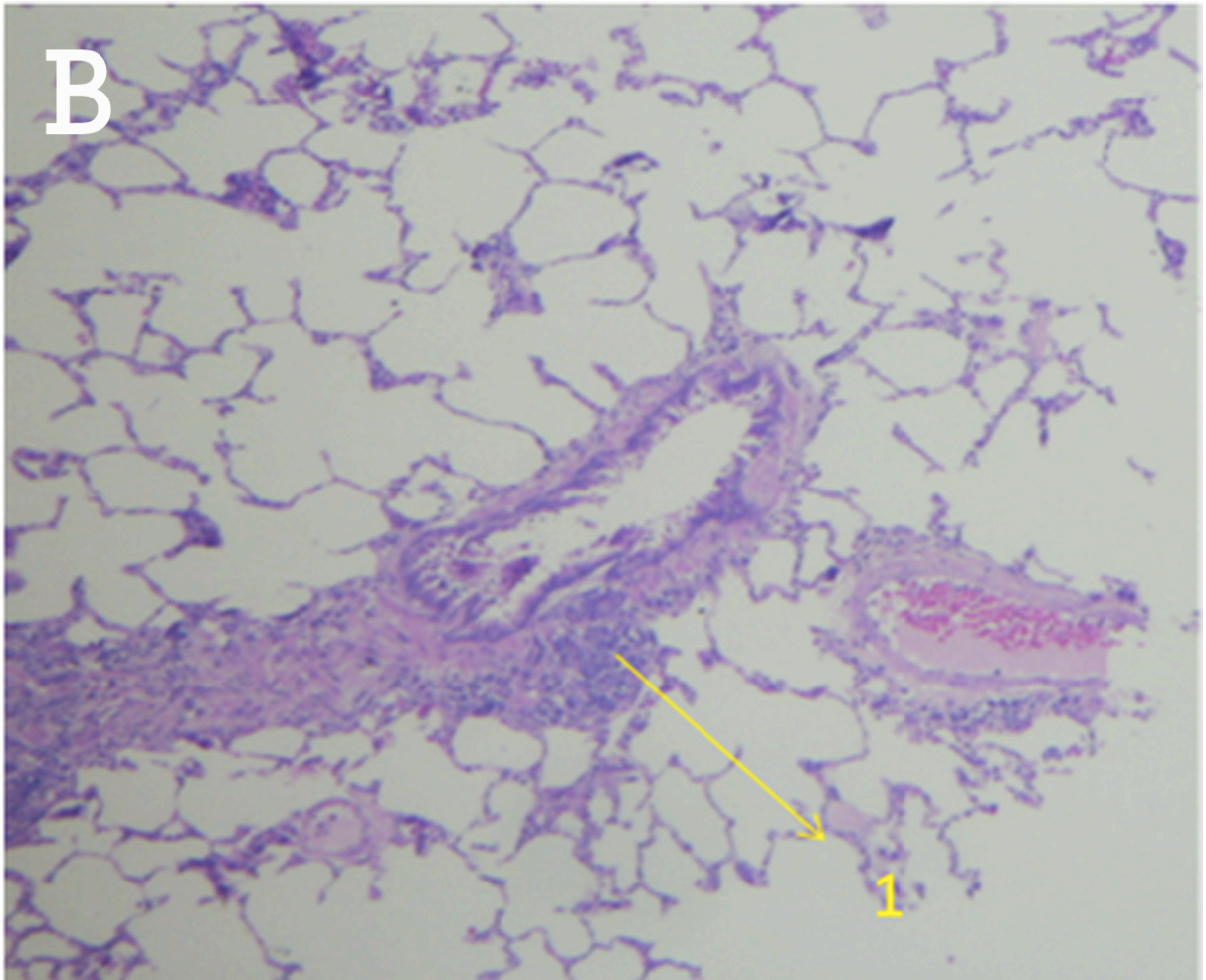


Figura 14 - Microfotografia de pulmão de rato do subgrupo III (lavagem da cavidade abdominal com soro fisiológico 0,9% e enxugamento), com infiltrado linfocitário em disposição nodular peribronquiolar (seta).
Coloração (HE) aumento 10X

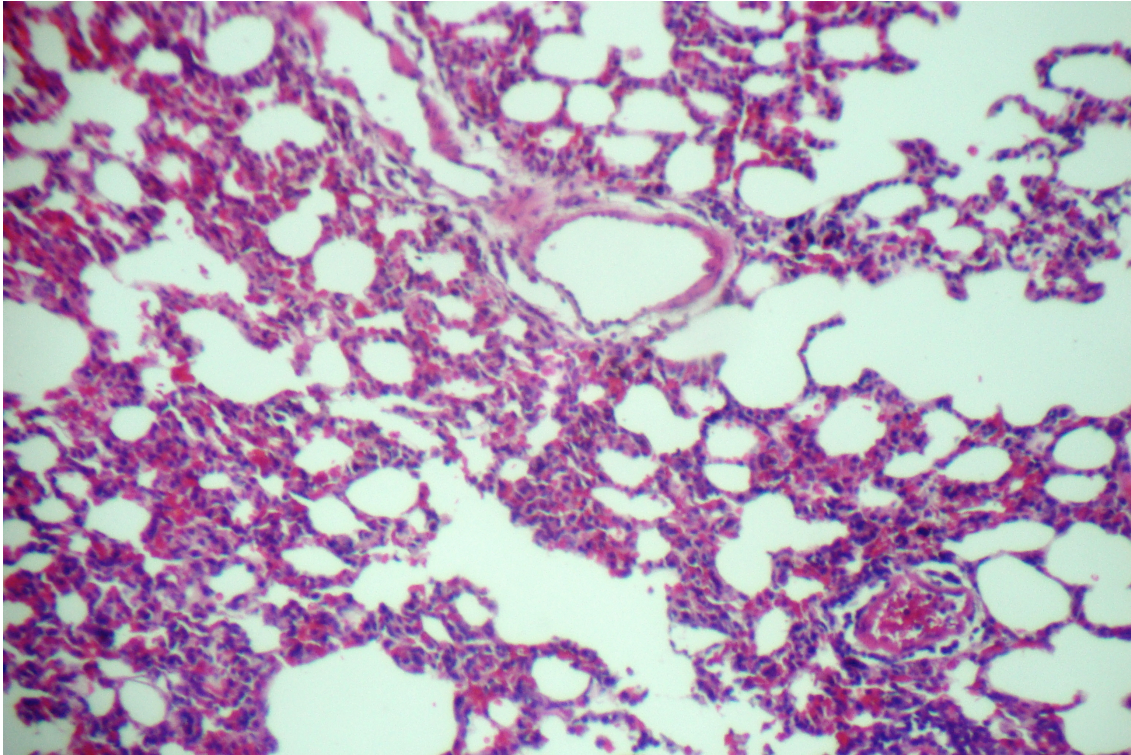


Figura 15 - Microfotografia de pulmão de rato do subgrupo IV (lavagem da cavidade abdominal com ropivacaína a 0,2% e enxugamento), dentro dos limites da normalidade. Coloração (HE) aumento 4X

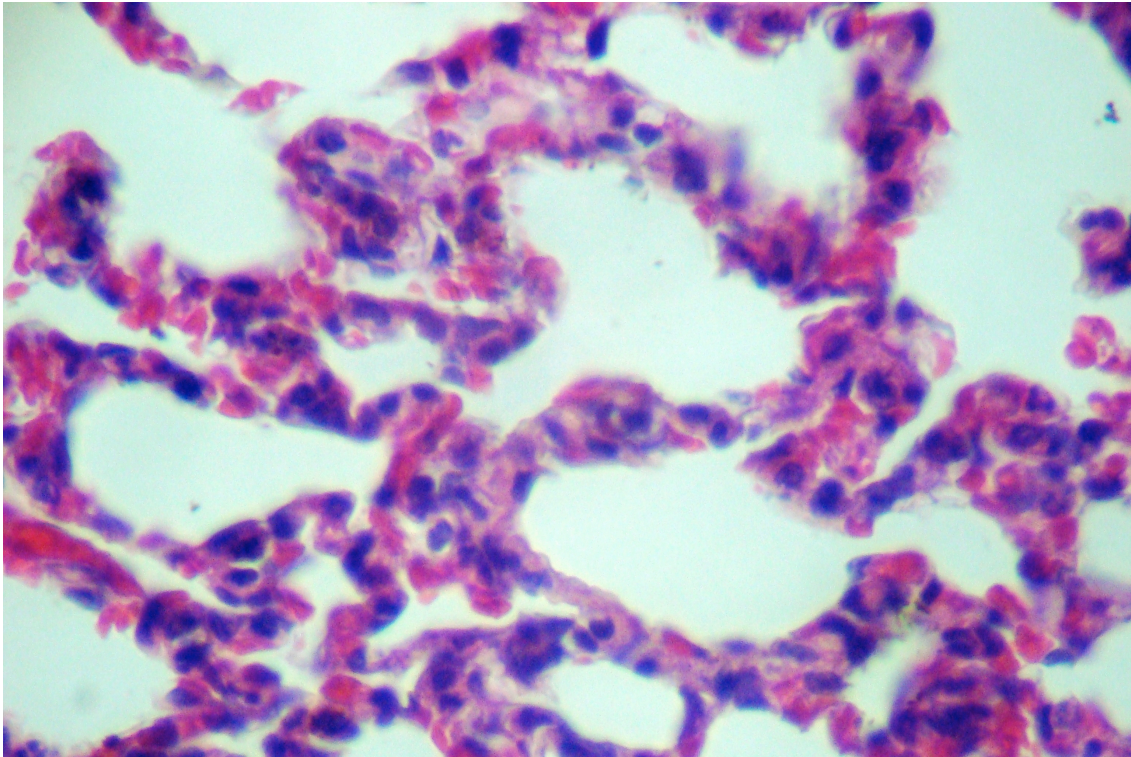


Figura 16 - Microfotografia de pulmão de rato do subgrupo IV (lavagem da cavidade abdominal com ropivacaína a 0,2% e enxugamento), dentro dos limites da normalidade. Coloração (HE) aumento 40X

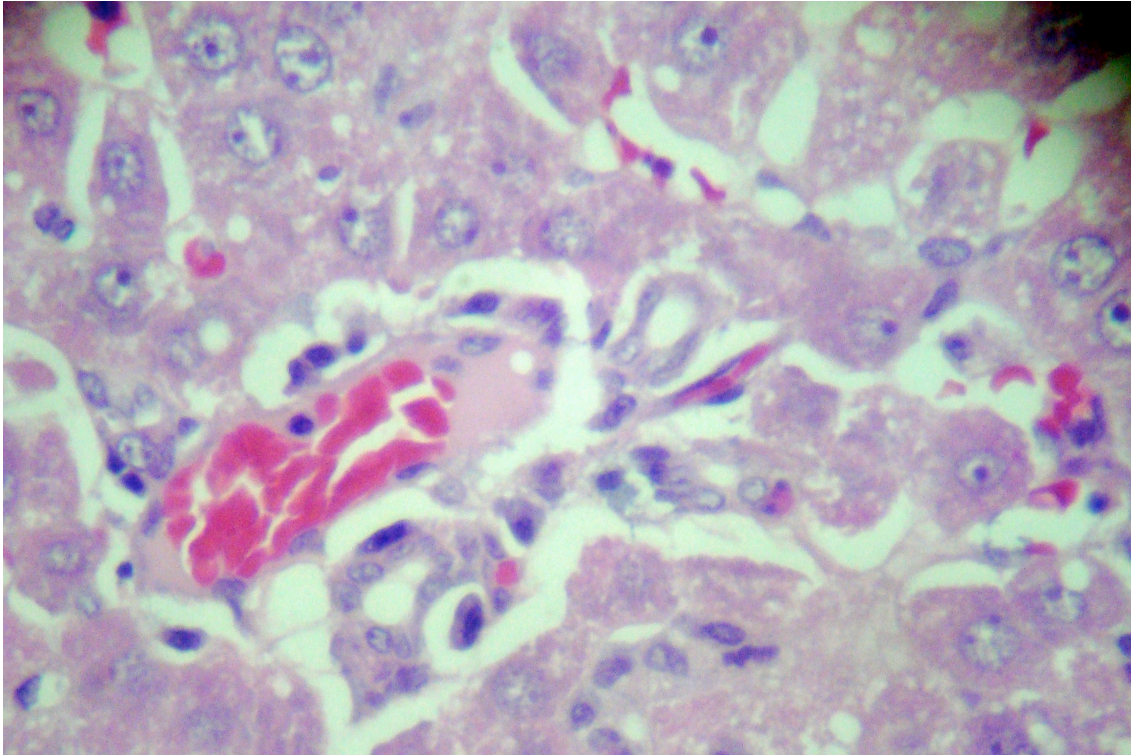


Figura 17 - Microfotografia de fígado de rato do subgrupo IV (lavagem da cavidade abdominal com ropivacaína a 0,2% e enxugamento), com arquitetura acinar preservada. Coloração (HE) aumento 40X

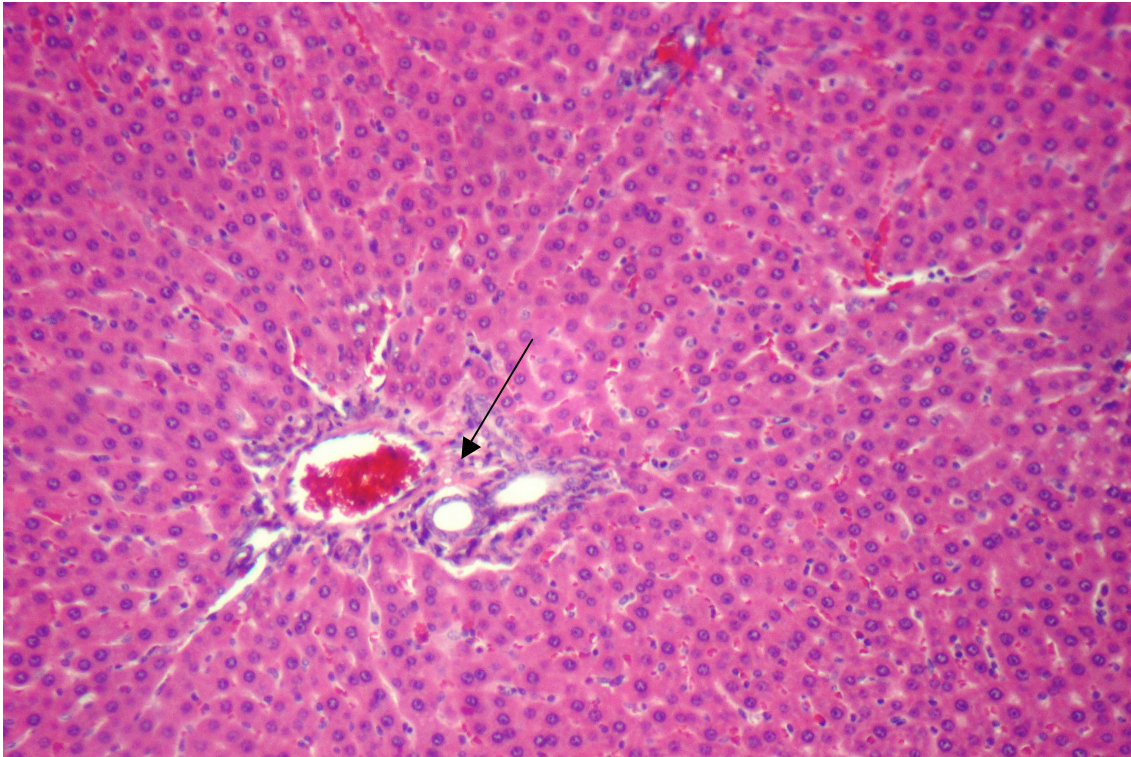


Figura 18 - Microfotografia de fígado de rato do subgrupo III (lavagem da cavidade abdominal com soro fisiológico a 0,9% e enxugamento), com espaço porta normal e com presença de pequenos linfócitos (seta).
Coloração (HE) aumento 10X

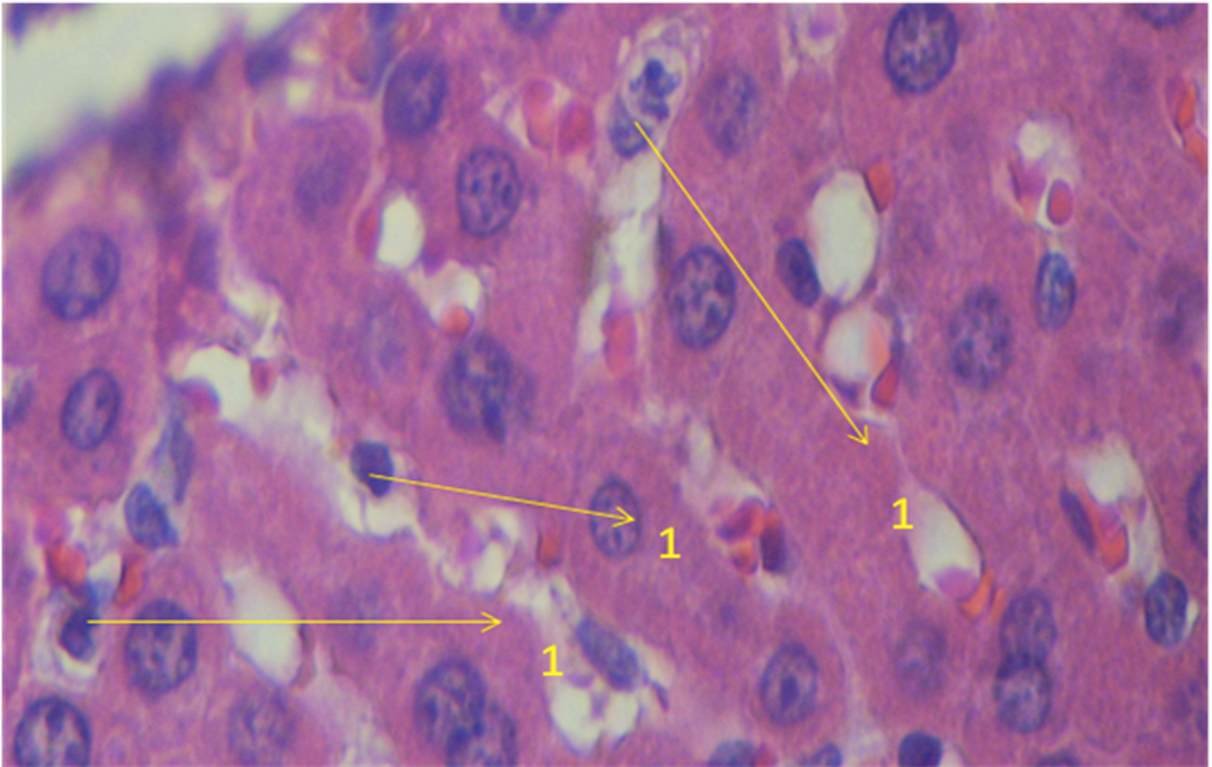


Figura 19 - Microfotografia de fígado de rato do subgrupo II (enxugamento da cavidade abdominal), com intensa inflamação predominantemente de mononucleares (setas). Coloração (HE) aumento 40X

Tabela 1. Estatísticas descritivas da resposta inflamatória (contagem celular) de Pulmões de ratos submetidos à peritonite fecal em campo de grande aumento (CGA 40X).

Subgrupos	N	Média	Desvio-padrão
I - Controle	5	305,33	8,74
II - Enxugamento	5	257,33	5,51
III - Soro Fisiológico	5	80,33	2,52
IV - Ropivacaína	5	24,67	2,08

Os resultados da histopatologia de peritônio de ratos do grupo A, submetidos a peritonite fecal experimental, mostraram que os animais dos subgrupos controle (subgrupo I) e enxugamento (subgrupo II) apresentaram intensa reação inflamatória linfocítica (Figuras 8 e 9).

Os animais do subgrupo soro fisiológico 0,9% (subgrupo III) apresentaram histopatologia com reação inflamatória do tipo crônica (Figura 6) e granulomatosa do tipo corpo estranho (Figura 5) com intenso infiltrado de plasmócitos (Figura 10).

Nos animais do subgrupo ropivacaína (subgrupo IV) os achados histopatológicos mostraram escasso infiltrado inflamatório crônico linfocítico (Figura 7).

Os achados histológicos em pulmões dos animais do subgrupo controle (subgrupo I) apresentaram intensa infiltração do tipo linfocitária (Figura 12), hemorragia alveolar difusa com espessamento dos septos alveolares ocupados por macrófagos e monócitos (Figura 11).

No subgrupo enxugamento (subgrupo II) a histopatologia mostrou infiltrado com exudato linfohistioplasmocitário e neutrofilico (Figura 13).

No subgrupo soro fisiológico 0,9% (subgrupo III) a histopatologia mostrou uma infiltração linfocitária peribronquiolar (Figura 14).

No subgrupo ropivacaína (subgrupo IV) foram encontrados achados histológicos compatíveis com a normalidade (Figuras 15 e 16).

Os achados histopatológicos em pulmões são compatíveis com a contagem de células inflamatórias em campo de grande aumento de 40X (CGA 40X), mostrados na tabela 1, isto porque os animais que tiveram a cavidade abdominal lavada com soro fisiológico a 0,9%

(subgrupo III) ou ropivacaína (subgrupo IV) apresentaram menor número de células inflamatórias.

A histopatologia de fígado dos animais do subgrupo enxugamento (subgrupo II) apresentaram reação inflamatória com infiltrado hepático de mononucleares (Figura 19).

Os animais do subgrupo soro fisiológico 0,9% (subgrupo III) apresentaram resultados histopatológicos dentro da normalidade e com presença de pequenos linfócitos (Figura 18).

No subgrupo ropivacaína (subgrupo IV) a histopatologia do fígado apresentou-se com arquitetura acinar preservada (Figura 17).

6.2 GRUPO B

6.2.1 Dosagem de TNF- α

Tabela 2 - Estatísticas descritivas da dosagem de TNF- α em ratos submetidos à peritonite fecal.

Subgrupos	Mediana(pg/mL)	Máx – Mín (pg/mL)	Valores de <i>p</i>	
			Soro Fisiológico	Ropivacaína
I – Controle	441,44	512 – 370	0,56	0,021
II - Enxugamento	459,50	563 – 350	0,38	0,021
III - Soro Fisiológico	327,65	515 – 157	-	0,021
IV - Ropivacaína	32,45	60 – 24	0,021	-

Teste estatístico – teste de Mann-Whitney entre os subgrupos

P valor $\leq 0,05$

Observa-se pela tabela 2 que as dosagens de TNF- α em picogramas por mililitro (pg/mL) foram menores nos subgrupos em que houve lavagem da cavidade abdominal com soro fisiológico 0,9% (subgrupo III) e, ou com ropivacaína 0,2% (subgrupo IV). O subgrupo ropivacaína (subgrupo IV) apresentou diferenças estatisticamente significantes ($p < 0,05$) em relação aos demais subgrupos controle (subgrupo I), enxugamento (subgrupo II) e soro fisiológico 0,9% (subgrupo III). O subgrupo soro fisiológico (subgrupo III) não apresentou diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$) em relação aos subgrupos controle (subgrupo I) e enxugamento (subgrupo II) mas foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao subgrupo ropivacaína (subgrupo IV).

6.2.2 Dosagem de IL-6

Tabela 3 - Estatísticas descritivas da dosagem de IL-6 em ratos submetidos à peritonite fecal

Subgrupos	Mediana (pg/mL)	Máx – Mín (pg/mL)	Valores de <i>p</i>	
			Soro Fisiológico	Ropivacaína
I - Controle	22.344,07	26450 -11618	0,08	0,021
II - Enxugamento	14.791,69	15083-13807	0,073	0,021
III - Soro Fisiológico	6.993,76	14301-1717	-	1,0
IV - Ropivacaína	3.220,87	4563-2329	1,0	-

Teste estatístico – teste de Mann-Whitney entre os subgrupos

$P \leq 0,05$

Na tabela 3 observamos que as dosagens de IL-6 em picogramas por mililitro (pg/mL) foram menores no subgrupo ropivacaína (subgrupo IV) em comparação aos subgrupos controle (subgrupo I), enxugamento (subgrupo II) e soro fisiológico 0,9% (subgrupo III). Embora, a dosagem de IL-6 tenha sido menor no subgrupo ropivacaína (subgrupo IV) em comparação com o subgrupo soro fisiológico 0,9% (subgrupo III), esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p > 0,05$). No entanto o subgrupo ropivacaína (subgrupo IV) foi estatisticamente significante ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos controle (subgrupo I) e enxugamento (subgrupo II). O subgrupo soro fisiológico (subgrupo III) apresentou menores valores de IL-6 em picogramas por mililitro (pg/mL) do que os subgrupos controle (subgrupo I) e enxugamento (subgrupo II) mas apresentou maiores valores de IL-6 do que o subgrupo ropivacaína (subgrupo IV). Este subgrupo soro fisiológico (subgrupo III) não foi significante ($p > 0,05$) em relação aos demais subgrupos controle (subgrupo I), enxugamento (subgrupo II) e subgrupo ropivacaína (subgrupo IV).

7. DISCUSSÃO

O modelo de peritonite experimental mais amplamente difundido é a ligadura e punção cecal (LPC) que foi descrita por Wichterman et al (1980)⁶³, técnica esta que utiliza um procedimento cirúrgico para a indução da peritonite. Nesse estudo optou-se por coleta das fezes autógenas diluída em soro fisiológico 0,9% e inoculada na cavidade peritoneal, por apresentar a vantagem de não necessitar a reintervenção cirúrgica no animal.

Todos os animais submetidos ao procedimento desenvolveram sinais macroscópicos de peritonite, evidenciados pela presença de secreção purulenta comprovada seis horas após por laparotomia (Figura 2). Cumpre ressaltar que os animais dos subgrupos I, II e III, que morreram, e os dos subgrupos III e IV, que sobreviveram, já apresentavam no pós-operatório imediato manifestações de sepse tais como taquipnéia, adinamia, anorexia, pilo ereção e halo escuro em torno dos olhos. Os mesmos sinais foram observados em estudo realizado por Guilgen e col. (1998).⁶⁴

A dose letal média (LD₅₀) da ropivacaína via intraperitoneal é de 54 mg/kg em ratos adultos e de 155 mg/kg em ratos jovens (Kohane 1998).⁶⁵ Nesse estudo a dose média de ropivacaína foi de aproximadamente 20 mg/kg, em ratos jovens.

Estudos anteriores demonstraram redução da mortalidade em ratos com peritonite fecal quando tratados por meio de lavagem peritoneal com lidocaina⁴⁹ ou bupivacaína⁵⁰. No presente estudo, a ropivacaína, apesar de apresentar efeito anti-inflamatório e antimicrobiano mais discreto que os outros anestésicos⁶⁶, também impediu a mortalidade no subgrupo IV.

As características histopatológicas dos fragmentos dos órgãos avaliados foram condizentes com a maior sobrevida dos animais dos subgrupos III e IV. A contagem de células inflamatórias do pulmão, em campo de grande aumento de 40 X, demonstrou um menor número de células inflamatórias nos subgrupos III e IV (Tabela 1). Os achados histopatológicos de fragmentos de pulmão, fígado e peritônio dos animais que tiveram a cavidade abdominal lavada com soro fisiológico 0,9% (subgrupo III) ou com solução de ropivacaína 0,2% (subgrupo IV) apresentaram menores alterações que os animais dos subgrupos controle (subgrupo I) e enxugamento (subgrupo II).

A ropivacaína apresentou, conforme nossos resultados, menor aumento dos níveis plasmáticos de TNF- α do que os demais subgrupos. Por outro lado, apesar da dosagem de IL-6 ser menor no subgrupo ropivacaína quando comparada com os outros subgrupos, esta

diferença não foi significativa em relação ao subgrupo que utilizou soro fisiológico 0,9%. Estes resultados corroboram dados da literatura que sugerem a eficácia da utilização de anestésicos locais na modulação do processo inflamatório nos modelos experimentais de peritonite séptica.

Os anestésicos locais atuam em várias etapas da cascata inflamatória. Vários estudos demonstraram uma redução reversível e dose-dependente da adesão dos leucócitos em paredes vasculares.^{67,68} A migração leucocitária também parece ser afetada pelos anestésicos, provavelmente por ação no citoesqueleto ou por atenuação na liberação de agentes quimiotáxicos pelos leucócitos.⁶⁹

Os anestésicos locais produzem uma inibição dose-dependente e reversível da fagocitose dos granulócitos.⁶⁹ A administração sistêmica intravenosa de lidocaína nas doses recomendadas para o tratamento antiarrítmico reduziu significativamente a atividade fagocitária dos leucócitos do líquido sinovial das articulações com sinovite.⁷⁰ No entanto, com a ropivacaína, demonstrou-se efeitos discretos ou nulos sobre a atividade fagocítica de granulócitos, ao contrário de outros agentes anestésicos locais.⁶⁶ O mecanismo mais plausível para explicar a inibição da atividade fagocitária é a diminuição da expressão do receptor de superfície de leucócitos⁷¹ e inibição da atividade dos filamentos de actinmiosina.⁷²

A aplicação tópica de levobupivacaína na dose de 10 mg/kg de peso, em ratos com colite experimental induzida por ácido sulfônico e etanol, demonstrou a diminuição de lesões histopatológicas confirmando o efeito anti-inflamatório desse anestésico local neste modelo experimental.⁷³

Apesar da eficácia da lavagem peritoneal ser controversa na literatura médica,^{74,75} estudo anterior demonstrou uma redução significativa da mortalidade quando utilizados anestésicos locais por via peritoneal.⁴⁹ Os anestésicos locais aumentaram a sobrevivência em vários estudos em modelos experimentais com camundongos⁷⁵ e cães,⁷⁶ mesmo quando administrados de modo sistêmico.

Além dos efeitos modulatórios na inflamação, os anestésicos locais apresentam comprovada ação antimicrobiana. Os dados da literatura mostram que a potência antimicrobiana dos anestésicos locais está essencialmente relacionada com a sua concentração e em menor grau com sua estrutura química, podendo ser efetivos contra a maioria das bactérias quando em concentrações suficientemente altas.⁷⁷

O mecanismo preciso de ação antibacteriana ainda não está claro, mas pode estar relacionada a interação dos anestésicos locais com a parede bacteriana ou com macromoléculas na superfície celular das bactérias. Interações eletrostáticas entre os

anestésicos locais catiônicos e componentes aniônicos da membrana poderiam induzir alterações funcionais da membrana celular, reduzindo a fluidez da membrana.⁷⁸

No presente estudo, a lavagem peritoneal com soro fisiológico (subgrupo III) não apresentou resultados estatisticamente significantes em relação as dosagens de IL-6 e TNF- α , quando comparada com os subgrupos controle (subgrupo I) e enxugamento (subgrupo II).

Estudos demonstraram que o TNF- α , citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos, monócitos e linfócitos e, que está envolvida com a resposta inflamatória aguda e sua transição para crônica com persistência da mesma, apresenta um pico de concentração plasmática de 2 horas, sendo seguido de um rápido declínio (meia vida de 18,2 min).⁴⁶ A IL-6, citocina pró-inflamatória produzida por células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, monócitos e linfócitos e que está envolvida com os mecanismos de citotoxicidade e morte celular sendo inclusive preditora de morte, é detectável em 60 minutos e apresenta um pico de concentração bifásico com 6 e 74 horas, com duração de 10 dias após exposição a endotoxinas.⁴⁶ Como a coleta foi realizada 12 horas após a indução da peritonite, as concentrações de TNF- α provavelmente apresentavam-se em declínio, aproximando estatisticamente os subgrupos.⁷⁹

A não significância estatística dos valores de IL-6 nos subgrupos ropivacaína e soro fisiológico 0,9%, ocorreu devido aos valores do intervalo de confiança do subgrupo ropivacaína estarem totalmente contidos no intervalo do subgrupo do soro fisiológico.

Os anestésicos locais são fármacos de grande disponibilidade nos hospitais, baixo custo e seguros – quando utilizados em doses apropriadas. O seu uso como modulador da resposta inflamatória na sepse pode representar uma excelente alternativa de tratamento, como demonstrado em vários modelos experimentais.^{48, 54-59, 73}

Novos estudos poderão ser desenvolvidos para avaliar outros anestésicos nas mesmas doses e em outros modelos de peritonite, associados ou não a outros recursos terapêuticos.⁸⁰

Mesmo admitindo que os dados obtidos em ratos, no laboratório de cirurgia experimental, ainda não tenham aplicação direta na conduta dos cirurgiões em seres humanos, esse estudo pode ser útil no planejamento de futuras pesquisas clínicas que atestem o real valor da adição de anestésicos locais na irrigação da cavidade peritoneal, em casos de peritonite.

8. CONCLUSÃO

A lavagem peritoneal com ropivacaína a 0,2%, no tratamento da peritonite fecal induzida com fezes autógenas em ratos, impediu a mortalidade no período avaliado, apresentou menor contagem de células inflamatórias e alterações histopatológicas no fígado, pulmão e peritônio e, reduziu os níveis plasmáticos da IL-6 e do TNF- α relacionados à resposta inflamatória e sepse.

9. REFERÊNCIAS (Normas de Vancouver)

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*. 2001; 29(7):1303-10.
2. Garrido AG, Figueiredo LFP, Rocha e Silva M. Modelos experimentais de sepse e choque séptico. *Acta Cir Bras*. 2004; 19(2): 82-88
3. Dellinger RP. Inflammation and coagulation. *Clin Infect Dis*. 2003; 36(10): 1259-65
4. Bone R, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992; 101:1644–55.
5. Webb SA, Pettila V, Seppelt I, et al. ANZIC Influenza Investigators. Criticalcare services and 2009 H1N1 influenza in Australia and New Zealand. *N Engl J Med* 2009; 361(20):1925–34.
6. Haveman JW, Muller Kobold AC, Tervaert JW, et al. The central role of monocytes in pathogenesis of sepsis: consequences for immuno monitoring and treatment. *Neth J Med* 1999; 55(3):132–41.
7. Ward PA. The dark side of C5a in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2004;4(2):133–42.
8. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2008; 8:776–87.
9. Cavaillon JM, Adib-conquy M, Fitting C, et al. Cytokine cascade in sepsis. *Scand J Infect Dis* 2003; 35:535–44.
10. Dinarello CA. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. *Chest* 1997; 112:321S–9S.
11. Dinarello CA. Proinflammatory cytokines. *Chest* 2000; 118:503–8
12. Philippart F, Cavaillon JM. Sepsis mediators. *Curr Infect Dis Rep* 2007; 9(5):358–65.
13. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet* 2005; 365:63–78
14. Cohen J. The immuno pathogenesis of sepsis. *Nature* 2002; 420:885–91.
15. Casey LC, Balk RA, Bone RC. Plasma cytokines and endotoxin levels correlate with survival in patients with the sepsis syndrome. *Ann Intern Med* 1993; 119:771–8.
16. Fisher CJJ, Opal SM, Dhainaut JF, et al. Influence of an anti-tumor necrosis factor monoclonal antibody on cytokine levels in patients with sepsis. *Crit Care Med* 1993; 21:318–27.

17. Tavares, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2000; 33(3):281-301
18. Batai I, Kerényi M, Tekeres M. The impact of drugs used in anaesthesia on bacteria. Eur J Anaesthesiol 1999; 16: 425-40
19. Cassuto J, Sinclair R, Bonderovic M. Anti-inflammatory properties of local anesthetics and their present and potential clinical implications. Acta Anaesthesiol Scand. 2006; 50(3):265-82.
20. Aydin ON, Eyigor M, Aydin N. Antimicrobial activity of ropivacaine and other local anaesthetics. J Anaesthesiol. 2001; 18(10): 687-94.
21. Fugger R, Zadrobilek E, Gotzinger P et al. Perioperative TNF alpha and IL-6 concentrations correlate with septic state, organ function and APACHE II scores in intra-abdominal infection. Eur J Surg 1993; 159: 525-29.
22. Patel RT, Deen KI, Youngs D, et al. Interleukin 6 is a prognostic indicator of outcome in severe intra-abdominal sepsis. Br J Surg 1994;81: 1306-8.
23. Hotzheimer RE, Shein M, Wittmann DH. Inflammatory response in peritoneal exudates and plasma of patients undergoing planned relaparotomy for severe secondary peritonitis. Arch Surg 1995; 130: 1314-20
24. Rogy M, Fugger R, Schemper M, et al. Unterschiedliche Aussagekraft von zwei verschiedenen Prognose-Scores bei Patienten mit Peritonitis. Chirurg 1990; 61:297-300.
25. Bone Rt. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and tARS. *crit care Med* 1996; 24: 125- 28.
26. Bone RC. Why sepsis trials fail. JAMA 1996; 276:565-66.
27. Goldie AS, Fearon KCH, Ross JA, et al. Natural cytokine antagonists and endogenous antiendotoxin core antibodies in sepsis syndrome. JAMA 1995; 274: 172- 77.
28. Bone RC. Towards a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response syndrome: what we do and do not know about cytokine regulation. Crit Care Med 1996; 24: 163- 72.
29. McLean LD, Meakins JL, Taguchi K, et al. Host resistance in sepsis and trauma. Ann Surg 1975; 182: 207-16.

30. Johnson WC, Ulrich F, Meguid MM, et al. Role of delayed hypersensitivity in predicting postoperative morbidity and mortality. *Am J Surg* 1979; 137:536-42.
31. Christou NV, Superina R, Broadhead M, et al. Postoperative depression of host resistance: determinants and effect of peripheral protein-sparing therapy. *Surgery* 1982; 92: 786-92.
32. Theadle W, Pemberton RM, Robinson D, et al. Lymphocyte subset responses to trauma and sepsis. *J Trauma* 1993; 35:844-49.
33. Platzer C, Meisel CH, Vogt K, et al. Up-regulation of monocytic IL-10 by tumor necrosis factor- α and cAMP elevating drugs. *Int Immunol* 1995; 7:517-23.
34. Stewart AG, Caotterill T, Harris T. Granulocyte and granulocyte-macrophage colony-stimulating factors exert differential effects on neutrophil platelet-activating factor generation and release, *Immunology* 1994; 82:51-56. 57.
35. Hudspeth AS. Radical surgical debridement of advanced generalized bacterial peritonitis. *Arch Surg* 1975; 110: 1233-36.
36. Santos JCM, Levy CE and Reis CU. Comparative effectiveness of pefloxacin plus metronidazole and gentamicin plus metronidazole in the adjuvant treatment of peritoneal infections. *Drug Invest* 1994; 8:1-9.
37. Hau T, Abrenholz DH, Simmons RL. Secondary bacterial peritonitis: biologic basis of treatment. *Curr Probl Surg* 1979; 16: 1-65. 6
38. Schein M, Saadia R, Decker G. Intraoperative peritoneal lavage. *Surg Gynecol Obstet* 1988; 66: 187-95.
39. Nathens AB, Rotstein OD. Therapeutic options in peritonitis. *Surg Clin North Am* 1994; 74:677-92.
40. Whiteside OJ, Tytherleigh MG, Thrush S, Farouk R, Galland RB. Intra-operative peritoneal lavage- who does it and why? *Ann R Coll Surg Engl.* 2005; 87(4): 225-8.
41. Platt J, Jones RA, Bucknall RA. Intraperitoneal antiseptics in experimental bacterial peritonitis. *Br J Surg.* 1984; 71(8):626-8.
42. McAviney DJ, McCollum PT, McElearney NG, Mundinger G Jr, Lynch G. Antiseptics in the treatment of bacterial peritonitis in rats. *Br J Surg.* 1983; 70(3):158-60.

43. Moukhtar M, Romnev S. Continuous intraperitoneal antibiotic lavage in the management of purulent sepsis of the pelvis. *Surg Gynecol Obstet.* 1980; 150(4): 548-50.
44. Jallouli M, Hakim A, Znazen A, Sahnoun Z, Kallel H, Zghal K, Hammami A, Mhiri R. Rifamycin lavage in the treatment of experimental intra-abdominal infection. *J Surg Res.* 2009; 155(2):191-4.
45. Saldivia C, Alejos R, Gilberto H. Peritonitis experimental em ratas y evaluación preliminar del tratamiento com lavado peritoneal y antibioticoterapia tópica. *Rev Venez Cir.* 2000; 53(2): 48-51.
46. Qadan M, Dajani D, Dickinson A, Polk HC Jr. Meta-analysis of the effect of peritoneal lavage on survival in experimental peritonitis. *Br J Surg.* 2010; 97(2):151-9.
47. Rimbäck G, Cassuto J, Wallin G, Westlander G. Inhibition of peritonitis by amide local anesthetics. *Anesthesiology.* 1998; 69(6): 881-6.
48. Gallos G, Jones R Dean, Nasr H Samih, Emala W Charles, Lee Thomas H. Local anesthetics reduce mortality and protect against renal and hepatic dysfunction in murine septic peritonitis. *Anesthesiology.* 2004; 101(4): 902-11.
49. Brocco MC, Paulo DNS, Baptista JFA, Carraretto AR, Ferrari TA, Silva AL, et al. Effects of peritoneal lavage with lidocaine on survival of rats with fecal peritonitis. *Acta Cirur Bras.* 2008; 23(1): 42-7.
50. Brocco MC, Paulo DNS, Baptista JFA, Carraretto AR, Ferrari TA, Silva AL, et al. Effects of peritoneal lavage with bupivacaine on survival of rats with fecal peritonitis. *Rev Bras Anesthesiol.* 2008; 58(5): 474-9.
51. Olsen KM, Peddicord TE, Campbell GD, Rupp ME. Antimicrobial effects of lidocaine in bronchoalveolar lavage fluid. *J AntimicrobChemother.* 2000; 45 (2): 217-9.
52. Parr AM, Zoutman DE, Davidson JS. Antimicrobial activity of lidocaine against bacteria associated with wound infection. *Ann Plast Surg.* 1999; 43(3): 239-45.
53. Feldman JM, Chapin-Robertson K, Turner J. Do agents used for epidural analgesia have antimicrobial properties? *Reg Anesth.* 1994; 19(1):43-7.

54. Xiao Wei Zhang, HenrikThorlacius. - Inhibitory actions of ropivacaine on tumor necrosis factor- α - induced leukocyte adhesion and tissue accumulation in vivo. *Eur J Pharmacol.* 2000; 24:392.
55. De Iuliis A, Zanatta L, Vincenti E, Galzigna L. Differences of ropivacaine and bupivacaine relevant to antiinflammatory activity, platelet aggregation and antioxidant activity in vitro. *Farmaco.* 2001; 56(3):153-7.
56. Li CY, Tsai CS, Hsu PC, Chueh SH, Wong CS, Ho ST. Lidocaine attenuates monocyte chemoattractant protein-1 production and chemotaxis in human monocytes: possible mechanisms for its effects on inflammation. *Anesth Analg.* 2003; 97(5):1312-6.
57. Takao Y, Mikawa K, Nishina K, Maekawa N, Obara H. Lidocaine attenuates hyperoxic lung injury in rabbits. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1996; 40(3):318-25.
58. Konrad CJ, Schuepfer GK, Neuburger M, Schley M, Schmelz M, Schmeck J. Reduction of Pulmonary Edema by Short-Acting Local Anesthetics. *Reg Anesth Pain Med.* 2006; 31(3):254-9.
59. Flondor M, Listle H, Kemming GI, Zwissler B, Hofstetter C. Effect of inhaled and intravenous lidocaine on inflammatory reaction in endotoxaemic rats. *Eur J Anaesthesiol.* 2010; 27(1):53-60.
60. Petroianu A, Carvalho e Carneiro BGM, Rodrigues FHOC, Rocha RF. Avaliação da reinfecção peritoneal após peritonite fecal em ratos. *Rev Col Bras Cir.* 2004; 31(2): 90- 4.
61. Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LM, et al. Procedimentos Experimentais. In: *Princípios Éticos e Práticos do uso de Animais de Experimentação.* São Paulo: CLR Balieiro Editores, 2004: 46-9.
62. Araujo Filho, Irami et al. Influência da laparoscopia e laparotomia na gasometria, leucócitos e citocinas em modelo de sepse abdominal em ratos. *Acta Cir. Bras.* [online]. 2006, vol.21, n.2, pp. 74-79. ISSN 1678-2674.
63. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock-a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res.* 1980; 29:189-201.

64. Guilgen GA, Czesko NG, Malafaia O, Simões JC. Peritonite infecciosa com quantitativos e qualitativos bacterianos conhecidos. *Rev Col Bras Cir.* 1998; 25(1): 39-43.
65. Kohane, Daniel S, Sankar, Wudbhav N, Shubina Maria MS, Hu Delphine et al. Sciatic nerve blockade in infant, adolescent and adult rats: , a comparison of ropivacaine and bupivacaine. *Anesthesiology.* 1998; 89(5): 1199-1208.
66. Kiefer RT, Ploppa A, Krueger WA et al. Local anesthetics impair human granulocyte phagocytosis activity, oxidative burst, and CD11b expression in response to *Staphylococcus aureus*. *Anesthesiology* 2003; 98: 842-8.
67. Schmidt W, Schmidt H, Bauer H, Gebhard MM, Martin E. Influence of lidocaine on endotoxin-induced leukocyte endothelial cell adhesion and macromolecular leakage in vivo. *Anesthesiology* 1997; 87: 617-24.
68. Azuma Y, Shinohara M, Wang PL, Suese Y, Yasuda H, Ohura K. Comparison of inhibitory effects of local anesthetics on immune functions of neutrophils. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22: 789-96.
69. Mio Y, Fukuda N, Kusakari Y, Tanifuji Y, Kurihara S. Bupivacaine attenuates contractility by decreasing sensitivity of myofilaments to Ca^{2+} in rat ventricular muscle. *Anesthesiology* 2002; 97: 1168-77.
70. Paul H, Clayburne G, Schumacher HR. Lidocaine inhibits leukocyte migration and phagocytosis in monosodium urate crystal-induced synovitis in dogs. *J Rheumatol* 1983; 10: 434-9.
71. Welters ID, Menzebach A, Langefeld TW, Menzebach M, Hempelmann G. Inhibitory effects of S(-) and R-(b) bupivacaine on neutrophil function. *Acta Anaesthesiol Scand* 2001; 45: 570-5.
72. Tsuda Y, Mashimo T, Yoshiya I, Kaseda K, Harada Y, Yanagida T. Direct inhibition of the actomyosin motility by local anesthetics in vitro. *Biophys J* 1996; 71: 2733-41.
73. Duman U, Aysun Y, Ozturk et al. Anti-inflammatory efficiency of levobupivacaine in an experimental colitis model. *World Gastroenterol.* 2010 May 28; 16(20):2537-2541.
74. Whiteside OJ, Tytherleigh MG, Thrush S et al. - Intra-operative peritoneal lavage - who does it and why? *Ann R Coll Surg Engl*, 2005; 87: 255-258.

75. Torres OJM, Macedo EL, Melo TCM et al. - Peritonite fecal em ratos: eficácia da lavagem peritoneal com solução de cloreto de sódio a 0,9%. *Acta Cir Bras*, 1999; 14:65-68.
76. Fletcher JR, Ramwell PW. E. coli endotoxin shock in the dog; treatment with lidocaine or indomethacin. *Br J Pharmacol* 1978; 64: 85-91.
77. Feldman JM, Chapin-Robertson K, Turner J. Do agents used for epidural analgesia have antimicrobial properties? *Reg Anesth* 1994; 19: 43-7.
78. Tanji K, Ohta Y, Kawato S, Mizushima T, Natori S, Sekimizu K. Decrease by psychotropic drugs and local anaesthetics of membrane fluidity measured by fluorescence anisotropy in *Escherichia coli*. *J Pharm Pharmacol* 1992; 44: 1036-7.
79. Oliver JC, Bland LA, Oettinger CW, Arduino MJ, McAllister SK, Aguero SM, Favero MS. Cytokine kinetics in an in vitro whole blood model following an endotoxin challenge. *Lymphokine Cytokine Res*. 1993; 12(2):115-20.
80. Benjamin CF. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. *Medicina (Ribeirão Preto)* 2001; 34(1): 18-26.

10. ANEXOS

ANEXO 1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 28/2009**, relativo ao projeto intitulado "**Efeitos do tratamento intraperitoneal com ropivacaína 0,2% na sobrevida de ratos submetidos à peritonite**", que tem como responsável(is) **Renato Santiago Gomez**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **20/ 05/2009**.

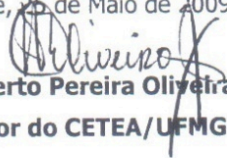
Este certificado expira-se em **20/ 05/ 2014**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 28/2009**, related to the project entitled "**Effects of treatment with intraperitoneal ropivacaine 0,2% on the survival of the rats submitted to peritonitis**", under the supervisors of **Renato Santiago Gomez**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **May 20, 2009**.

This certificate expires in **May 20, 2014**.

Belo Horizonte, 25 de Maio de 2009.


Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

ANEXO 2

Acta Cirurgica Brasileira

versão On-line ISSN 1678-2674

Resumo

[BROCCO, Marcos Célio](#) et al. **Histological features of peritoneal lavage with ropivacaine in rats with fecal peritonitis.** *Acta Cir. Bras.* [online]. 2012, vol.27, n.2, pp. 193-199. ISSN 1678-2674. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502012000200016>.

PURPOSE: To evaluate the histological features in lungs, peritoneum and liver of rats subjected to fecal peritonitis and treated with peritoneal lavage with 0.2% ropivacaine. **METHODS:** Twenty Wistar rats were subjected to laparotomy 6 h after the fecal peritonitis induction with autogenous stool. Rats were randomly distributed into 4 groups: I - (n=5) Control, no treatment; II - (n=5) Drying of the abdominal cavity; III - (n=5) Abdominal cavity lavage with 3 ml 0.9% saline solution and drying; and IV - (n=5) Abdominal cavity lavage with 3 ml 0.2% ropivacaine and drying. The animals that died underwent necropsy, and the surviving ones were subjected to euthanasia on the 11th day post-surgery. Fragments of liver, lungs and peritoneum were removed for histological evaluation. **RESULTS:** The animals that received peritoneal lavage (groups III and IV) showed greater survival than the drying and control groups. Lavage with ropivacaine prevented death during the observed period. Peritoneal lavage with ropivacaine maintained the architecture of the lung, peritoneum and liver without any important histological alterations. The histopathological findings analyzed correlated with greater survival of group IV. **CONCLUSION:** Treatment of fecal peritonitis in rats with peritoneal lavage using 0.2% ropivacaine demonstrated a reduction in histopathological alterations related to inflammatory response and sepsis.

Palavras-chave : Peritonitis; Peritoneal Lavage; Anesthetics; Sepsis; Rats

ANEXO 3

Acta Cirurgica Brasileira

versão On-line ISSN 1678-2674

Resumo

[BROCCO, Marcos Célio](#) et al. **A study of interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) serum levels in rats subjected to fecal peritonitis and treated with intraperitoneal ropivacaine.** *Acta Cir. Bras.*[online]. 2012, vol.27, n.7, pp. 494-498. ISSN 1678-2674. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502012000700011>.

PURPOSE: The objective of this study was to assess the cytokine serum levels of IL-6 and TNF- α in rats subjected to fecal peritonitis and treated with peritoneal lavage with 0.2% ropivacaine by peritoneal lavage. **METHODS:** We subjected 16 Wistar rats to laparotomy 6 hours after the induction of fecal peritonitis with autogenous stool and subsequently divided the rats randomly into 4 groups: I-control, no treatment; II- drying of the abdominal cavity; III- lavage of the abdominal cavity with 3 mL of 0.9% normal saline and drying; IV- lavage of the abdominal cavity with 3 mL of 0.2% ropivacaine and drying. Six hours following the laparotomy, the animals underwent cardiac puncture, and 1 mL of blood was collected for cytokine assessment before the animals were euthanized. **RESULTS:** The lavage with ropivacaine resulted in smaller TNF- α levels compared with those observed in the other treatment groups ($p < 0.05$). Regarding IL-6, the ropivacaine group showed lower cytokine levels than those observed in groups I and II, but there was no significant difference ($p > 0.05$) between groups III and IV. **CONCLUSION:** Peritoneal lavage with 0.2% ropivacaine was shown to reduce plasma levels of IL-6 and TNF- α in the treatment of fecal peritonitis in rats.

Palavras-chave : Peritonitis; Anesthesia; Sepsis; IL-6; TNF- α .

ANEXO 4



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte – MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE **MARCOS CELIO BROCCO**, nº de registro 2010654263.

Às quatorze horas do dia 06 de agosto de dois mil e doze, reuniu-se na Faculdade de Medicina Universidade Federal de Minas Gerias, a Comissão Examinadora de tese indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“EFEITOS DA UTILIZAÇÃO INTRAPERITONEAL DE ROPIVACAÍNA 0,2% NA SOBREVIDA DE RATOS SUBMETIDOS À PERITONITE FECAL”**, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e a Oftalmologia. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Renato Santiago Gomez, após dar a conhecer aos presentes o teor das normas regulamentares do trabalho final passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença do candidato e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. Renato Santiago Gomez/Orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Danilo Nagib Salomão Paulo/ Co-orientador	Instituição: EMESCAM	Indicação: _____
Prof. João Baptista de Rezende Neto <u>Aprovado</u>	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Marcelo Eller Miranda	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Antônio Roberto Carraretto	Instituição: UFES	Indicação: <u>Desseleto</u>
Profa. Ângela Maria Sousa	Instituição: USP	Indicação: <u>Aprovado</u> APROVADO

Pelas indicações, o candidato foi considerado Aprovado.

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 06 de Agosto de 2012.

Prof. Renato Santiago Gomez/Orientador Renato Santiago Gomez
 Prof. Danilo Nagib Salomão Paulo/ Coorientador AUSENTE
 Prof. João Baptista Rezende Neto [Assinatura]
 Prof. Marcelo Eller Miranda [Assinatura]
 Prof. Antonio Roberto Carraretto [Assinatura]
 Prof. Ângela Maria Sousa [Assinatura]
 Prof. Marcelo Dias Sanches/Coordenador [Assinatura]

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Prof. Marcelo Dias Sanches
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em
Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia
Faculdade de Medicina/UFMG

ANEXO 5




FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640



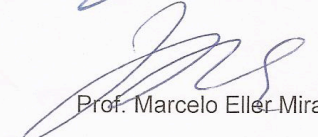
DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores, Renato Santiago Gomez, Danilo Nagib Salomão Paulo, João Baptista de Rezende Neto, Marcelo Eller Miranda, Antônio Roberto Carraretto e Ângela Maria Sousa, aprovou a defesa da tese intitulada: **“EFEITOS DA UTILIZAÇÃO INTRAPERITONEAL DE ROPIVACAÍNA 0,2% NA SOBREVIDA DE RATOS SUBMETIDOS À PERITONITE FECAL”**, apresentada pelo doutorando **MARCOS CELIO BROCCO**, para obtenção do título de Doutor em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 06 de Agosto de 2012.


Prof. Renato Santiago Gomez
Orientador

Prof. Danilo Nagib Salomão Paulo
Co-orientador


Prof. João Baptista de Rezende Neto


Prof. Marcelo Eller Miranda


Prof. Antônio Roberto Carraretto


Profa. Ângela Maria Sousa