

GIOVANI DE FIGUEIREDO LOCKS

**DETERMINAÇÃO DO GL_{50} EM DOIS MODELOS DE SEPSE
EXPERIMENTAL.**

**Dissertação apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Ciências Médicas
da Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do título
de Mestre em Ciências Médicas**

**Coordenador do Curso: Prof.^a Dr.^a Tânia Silvia Fröde
Orientador: Prof. Dr. Armando José d'Acampora**

**Florianópolis
2012**

Locks, Giovani de Figueiredo

Determinação do GL50 em dois modelos de sepse experimental [dissertação] / Giovani de Figueiredo Locks ; orientador, Armando José d'Acampora – Florianópolis, SC, 2012
49 p. ; 21 cm

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas.

Inclui referências

1. Ciências Médicas. 2. Sepse. Modelos Animais. I. d'Acampora, Armando José . II Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a DEUS, pois Ele tem me cuidado como um filho muito amado em todos os meus caminhos. Oro para que este estudo nos ajude, de alguma forma, a cuidar de pessoas que porventura estiverem enfermas.

Gostaria de agradecer à minha família, minha amada Gabriela e meus dois filhos - Isabela e Felipe - o sorriso de vocês é o que me alimenta.

Gostaria de agradecer à Prof^ª. Dr^ª. Maria Cristina Simões de Almeida, a pessoa que mais me estimula a crescer nesta profissão.

Gostaria de agradecer ao Prof. Armando José d'Acâmpora, que me adotou e me ensinou que "estudar vale a pena".

Gostaria de agradecer aos funcionários do laboratório da TOCE, sem os quais este estudo seria impossível, Prazeres, Maico e Carlos. Eu imaginava que mais de 10 anos de prática da anestesia em seres humanos seriam suficientes para fazer dormir animais de pequeno porte. Obrigado por compartilhar os segredos comigo.

RESUMO

INTRODUÇÃO Ainda não foi descrito um modelo experimental ideal de para estudo da sepse. O modelo mais utilizado consiste na ligadura e perfuração do ceco. Neste estudo foi avaliado um novo modelo.

OBJETIVO: Este estudo tem o objetivo de estimar o calibre de agulha letal mediano (GL50) do novo modelo e compará-lo ao GL50 do modelo clássico.

MATERIAL E MÉTODO Foram utilizados 22 ratos machos albinos da linhagem Wistar. Os animais foram distribuídos em dois grupos - Grupo I (GWi): os animais foram submetidos a sepse experimental por ligadura e punção do ceco; Grupo II (GdAc): os animais foram submetidos a sepse experimental por ligadura do cólon ascendente e punção do ceco. Para a estimativa do GL50 foi utilizado o método sequencial *up-and-down*.

RESULTADOS O GL50 no Grupo I (Gwi) foi 19 Gauge (Intervalo de Confiança 17 a 22 Gauge). No Grupo II (GdAc) não foi possível o cálculo do GL 50, pois houve óbito em todos os animais.

CONCLUSÕES O modelo que foi avaliado neste ensaio tem letalidade muito alta. Futuras pesquisas são necessárias para estabelecer o papel do modelo Obstrução e Perfuração Intestinal nos estudos sobre a fisiopatologia e tratamento da sepse e da obstrução intestinal.

Palavras-chave: sepse. modelos animais.

SUMMARY

INTRODUCTION An ideal model of experimental sepsis was not yet described. The most popular model is Cecal Ligation and Puncture. In this study, a new model was evaluated.

OBJECTIVE The aim of this study was to estimate the lethal needle diameter in 50% of cases (GL50) of the new model and compare it to the GL50 of the classic one.

MATERIAL AND METHODS Male albino Wistar rats were studied (n=22). Animals were allocated into two study groups – Group I (GWi): experimental sepsis was induced by cecal ligation and puncture; Group II (GdAc): experimental sepsis was induced by ascending colon ligation and cecal puncture. Up-and-down method was used to determine the GL50.

RESULTS GL50 in Group I (GWi) was 19 Gauge (Confidence Interval 17 to 22 Gauge). In Group II (GdAc), determination of GL50 was not possible due to death of all animals in this group.

CONCLUSIONS The new model tested in this trial has a too high lethality. Future research will define the role of the model "Intestinal Obstruction and Perforation" in research about physiology and treatment of sepsis and intestinal obstruction.

Keywords: sepsis. models, animal.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática da diferença entre os modelos de sepse experimental propostos por Wichterman e d'Acampora. No modelo proposto por Wichterman, há ligadura do ceco. No modelo proposto por d'Acampora, há ligadura do colo ascendente. Em ambos os modelos o ceco é perfurado	23
Figura 2 - Posição cirúrgica do animal anestesiado após tricotomia. ...	26
Figura 3 - Marcação do tamanho da incisão abdominal.....	27
Figura 4 - Laparotomia mediana de quatro centímetros.	27
Figura 5 - Inventário da cavidade e exposição do ceco.	28
Figura 6 - Local da ligadura com fio de seda 3-0 na porção média do ceco. (Grupo I – GWi).	29
Figura 7 - Local da ligadura com fio de seda 3-0 na porção proximal do colo ascendente (Grupo II – GdAc)	30
Figura 8 - Dupla perfuração com agulha 18G em porção avascularizada do ceco, em animal alocado no Grupo I (GWi)	31
Figura 9 - Fechamento da parede abdominal com fio de nylon 3-0 utilizando sutura contínua.	32
Figura 10 - Fechamento da derme e epiderme com fio de nylon 3-0 utilizando sutura contínua.	33
Figura 11 - Calibres de agulha utilizados nos nas cirurgias dos animais alocados no Grupo I.	36
Figura 12 - Calibres de agulha utilizados nos nas cirurgias dos animais alocados no Grupo II.	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SIRS Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica

PaCO₂ Pressão parcial arterial de Dióxido de Carbono

LPS Lipopolissacarídeo

GL50 Calibre de Agulha Letal Mediano na escala *Standard Wire Gauge*

TOCE/UFSC Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental do Departamento de Clínica Cirúrgica da Universidade Federal de Santa Catarina

SBCAL Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório

GWi Grupo de animais submetidos a sepse experimental segundo o modelo preconizado por Wichterman

GdAc Grupo de animais submetidos a sepse experimental segundo o modelo preconizado por d'Acampora

UTI Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1.	MODELOS EXPERIMENTAIS DE SEPSE	18
1.1.1.	Injeção de endotoxina	19
1.1.2.	Infusão ou instilação de bactérias vivas	20
1.1.3.	Alteração da barreira endógena protetora do animal	21
1.1.3.1.	Ligadura e punção de ceco	21
1.1.3.2.	Peritonite por <i>stent</i> no cólon ascendente	21
1.1.4.	Justificativa	23
2.	OBJETIVO	24
3.	MÉTODOS	25
3.1.	AMOSTRA	25
3.2.	SUBGRUPOS DE ANIMAIS	25
3.3.	PROCEDIMENTOS	25
3.3.1.	Anestesia	25
3.3.2.	Etapa cirúrgica	26
3.4.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
4.	RESULTADOS	36
5.	DISCUSSÃO	38
6.	CONCLUSÕES	42
	REFERÊNCIAS	43

1. INTRODUÇÃO

Sepse é uma síndrome clínica caracterizada como uma resposta inflamatória sistêmica à infecção. É uma síndrome grave, que pode evoluir para choque séptico e disfunção de múltiplos órgãos e sistemas.(BONE et al., 1992)

O termo sepsis precisa ser contextualizado por algumas definições(BONE; GRODZIN; BALK, 1997; LEVY et al., 2003), pois o este termo tem sido usado para definir um conjunto de situações.

Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SIRS): duas ou mais das seguintes condições: febre (temperatura maior do que 38.5°C) ou hipotermia (temperatura inferior a 35.0°C); taquicardia (frequência cardíaca maior do que 90 batimentos/minuto); taquipnéia (frequência respiratória maior do que 20 movimentos respiratórios/minuto ou PaCO₂ inferior a 32mmHg); e leucocitose (leucócitos no sangue periférico superior a 12.000 células/ml ou mais de 10% de células imaturas).

Sepsis: Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica em resposta a infecção documentada (cultura ou bacterioscopia pelo método de Gram positiva para microorganismos no sangue, urina ou fluido corporal normalmente estéril ou foco infeccioso identificado visualmente)

Sepsis grave: Sepsis e pelo menos um dos seguintes sinais de hipoperfusão ou disfunção de órgãos: áreas de pele esbranquiçadas; enchimento capilar maior do que três segundos; oligúria (débito urinário inferior a 0.5 ml/kg por pelo menos uma hora ou terapia de substituição renal); lactato sérico superior a 2 mmol/l; alteração abrupta no nível de consciência; contagem de plaquetas inferior a 100.000 células/ml ou coagulação intravascular disseminada, lesão pulmonar aguda ou disfunção cardíaca (diagnosticada pela ecocardiografia).

Choque séptico: Sepsis e uma das seguintes condições: pressão arterial média inferior a 60 mmHg (80 mmHg se previamente hipertenso) após 20-30 ml/kg de colóides ou 40-60 ml/kg de solução salina fisiológica ou pressão capilar pulmonar entre 12 e 20 mmHg; necessidade de dopamina maior de 5µg/kg/min, ou noradrenalina ou adrenalina maior do que 0,25 µg/kg/min para manter uma pressão arterial média superior a 60 mmHg (80 mmHg se previamente hipertenso).

Falência de múltiplos órgãos: Alteração na função orgânica de forma que a homeostasia não possa ser mantida sem intervenção

terapêutica. Geralmente são utilizados parâmetros de seis órgãos-chave: pulmonar, cardiovascular, renal, hepático, neurológico e coagulação.

Síndrome da Resposta Antiinflamatória Compensatória: autoimunossupressão em resposta a uma grave lesão (como sepse, queimadura ou trauma) incumbida de restaurar a homeostasia após um estado de hiperativação inflamatória, cujos elementos clínicos são: anergia cutânea, hipotermia, leucopenia, susceptibilidade a infecção e incapacidade de curar uma infecção.

A taxa de mortalidade devido à sepse é alta e varia de 25-80%, dependendo de fatores epidemiológicos como idade, origem da infecção, estado prévio de saúde e predisposição individual. Foram detectados 750.000 casos de sepse por ano nos Estados Unidos, dos quais mais de 210.000 morreram. Os custos calculados para o tratamento de sepse nos Estados Unidos foram estimados em mais de 16 bilhões de dólares por ano.(ANGUS et al., 2001; ANGUS; WAX, 2001) Um estudo brasileiro mostrou que aproximadamente 15% dos pacientes admitidos em Unidades de Terapia Intensiva tem diagnóstico de sepse, com taxa de mortalidade global em 28 dias de 46,6%.(SALES JR et al., 2006) Os principais focos infecciosos de origem da sepse são trato respiratório (69%) e abdômen (23%).

A sepse é consequência de um desajuste complexo e multifatorial da resposta do hospedeiro à infecção, de maneira que os mecanismos inicialmente preparados para combater esta infecção tornam-se a causa de disfunções e danos tissulares graves.(HOTCHKISS; KARL, 2003)

Os agentes patogênicos são micro-organismos capazes de infectar os organismos superiores como os mamíferos. Durante uma agressão infecciosa, o processo inflamatório resulta da capacidade destes micro-organismos invadirem o hospedeiro local ou sistemicamente. Esta resposta imuno-inflamatória do hospedeiro baseia-se sobre componentes inatos e adaptativos. A **resposta imunitária inata**, ou não específica, constitui a primeira linha de defesa do organismo contra a infecção. Ela baseia-se sobre o reconhecimento de estruturas patogênicas e sobre uma resposta imediata sem necessidade de exposição prévia ao antígeno, cuja primeira expressão é a inflamação. A **resposta imunitária adaptativa**, ou específica, é por sua vez, caracterizada por um reconhecimento altamente específico do agente estranho, pela capacidade de reconhecer uma grande variedade de antígenos e de gerar uma resposta tardia

humoral e celular, assim como uma memória imunológica.(BARRAUD; GIBOT, 2007)

Pacientes com sepse grave morrem devido à falência de múltiplos órgãos e sistemas, mas não se sabe como uma infecção que é normalmente combatida na maioria das pessoas produz eventos tão catastróficos nestes pacientes.(TREACHER; BROWN, 2009) A teoria mais aceita é de que haja uma hiper-estimulação do sistema imune. Estudos em animais propõem evidências convincentes de que citocinas como Fator de Necrose Tumoral- α e Interleucina-1 ocupam um papel central na falência de órgãos, mas ensaios clínicos de antagonistas destas moléculas não aumentaram a sobrevida de pacientes com sepse. Foi demonstrado que a inibição de um agente pró-inflamatório tardio denominado *High-mobility group protein B1*, está associada à maior sobrevida em modelos experimentais de sepse, mesmo quando a inibição foi realizada 24 horas após a indução da sepse, evidenciando um importante papel desta via inflamatória na mortalidade da doença.(YANG et al., 2004) Outra teoria seria uma interação com a resposta compensatória do sistema imune. A sepse é caracterizada inicialmente por aumento nos mediadores inflamatórios, mas se ela persiste, há uma mudança para um estado de antinflamação imunossupressora. Isto poderia ser devido à liberação de citocinas antiinflamatórias como Interleucina-4 e Interleucina-10, anergia, morte de células imune. Ainda não se sabe se esta imunossupressão é primária ou compensatória ao estado inflamatório nos pacientes em sepse. Não é possível descartar fatores genéticos como possíveis agentes que favoreçam o desenvolvimento de estado de sepse.(HOTCHKISS; KARL, 2003)

Devido a sua alta taxa de mortalidade, uma estratégia adequada de **tratamento dos pacientes em sepse** é crucial para aumentar as chances de sobrevida dos pacientes. Esta estratégia é complexa(DELLINGER et al., 2008) e inclui reanimação inicial, diagnóstico, combate à infecção (antibioticoterapia e controle cirúrgico do foco infeccioso), fluidoterapia, vasopressores, terapia inotrópica, corticosteróides, Proteína C Ativada Recombinante Humana (Dotrecogina alfa-ativada) e administração de hemoderivados. Além disto, medidas para suporte das lesões de órgãos-alvo são propostas, isto é, terapia de ventilação mecânica, sedação, analgesia, controle glicêmico, terapia de substituição

renal, profilaxia de trombose venosa profunda e profilaxia de úlcera de estresse.

A maioria destas medidas, no entanto, não é dirigida contra a sepse em si, porém contra lesões secundárias em órgãos alvo. A administração de corticosteróide e Proteína C Ativada Recombinante Humana são as duas medidas que são dirigidas contra o processo fisiopatológico da sepse. Ambos as estratégias, no entanto, não são isentas de risco e tem valor terapêutico limitado. Embora o assunto seja controverso, um estudo europeu avaliou o efeito da hidrocortisona em pacientes sépticos e chegou à conclusão que seu uso não aumentou a sobrevida nem a reversão do choque séptico.(SPRUNG et al., 2008) O uso da Dotregogina alfa-ativada é ainda questionado, pois tomando por base 20 pacientes com peso médio de 80 kg, seriam necessários R\$ 1.540.000,00, para oportunizar apenas a um paciente a probabilidade de sobreviver ao 28º dia de internação.(MACHADO, 2007) Tornam-se necessárias novas medidas para o tratamento da sepse que sejam mais efetivas e tenham um custo acessível.

Tais medidas, entretanto, precisam ser desenvolvidas e testadas antes de sua aplicação em pacientes humanos gravemente enfermos.(D'ACAMPORA, A. J. et al., 2009) A Declaração de Helsinki, proposta pela Academia Mundial de Medicina em 1964, revisada em 1975, 1983, 1989, 1996, 2000, 2002, 2004 e 2008 cita em seus Princípios Básicos de Pesquisa Médica:

11- “A investigação médica em seres humanos deve estar em conformidade com os princípios médicos geralmente adotados e deve apoiar-se em um profundo conhecimento da bibliografia científica, em outras fontes de informação pertinentes, assim como em experimentos de laboratório corretamente realizados e experimentação animal, quando for oportuno. O bem-estar dos animais usados para pesquisa deve ser respeitado.”

1.1. MODELOS EXPERIMENTAIS DE SEPSE

Modelos experimentais de sepse foram propostos por vários autores devido à grande variabilidade e dificuldades em estudar a sepse humana com o objetivo de produzir estudos mais reprodutíveis da fisiopatologia da sepse e impacto de terapias.(BURAS; HOLZMANN; SITKOVSKY, 2005; DEITCH, 1998; FINK; HEARD, 1990;

WICHTERMAN; BAUE; CHAUDRY, 1980) Os modelos experimentais idealmente devem mimetizar o ritmo e a gravidade da sepse humana e de seu tratamento na Unidade de terapia Intensiva; reproduzir estágios hemodinâmicos e imunológicos; mimetizar achados histológicos em órgão alvo e exibir variabilidade entre animais.(DOI et al., 2009)

Modelos experimentais de sepse animal podem ser classificados em três categorias:

- a) Injeção de endotoxina
- b) Infusão ou instilação de bactérias exógenas
- c) Alteração da barreira endógena protetora do animal

1.1.1. Injeção de endotoxina

Lipopolissacarídeo (LPS) ou Endotoxina é o principal componente da parede celular das bactérias Gram-negativas. Ela estimula a liberação de mediadores inflamatórios de várias células e é responsável pelo início do processo de sepse. Quando administrada em humanos pode mimetizar o quadro de sepse. Em pacientes gravemente enfermos concentrações elevadas de LPS foram associadas ao desenvolvimento de sepse, gravidade de doença e morte. Níveis detectáveis de LPS estão presentes em 75% de pacientes com sepse. LPS pode ser armazenado na forma liofilizada e pode ser administrada em bolus ou infusão.(GARRIDO; FIGUEIREDO; SILVA, 2004) A sensibilidade a Endotoxina varia muito entre espécies (roedores são resistentes enquanto que primatas e humanos são mais sensíveis) . Outros fatores como gênero, idade, fase do ciclo menstrual e infecções concomitantes também são importantes. A duração, tipo de endotoxina e via de administração variam entre os estudos. Altas doses tendem a causar colapso cardiovascular e redução do débito cardíaco enquanto doses menores causam um estado hiperdinâmico, coagulopatia e disfunção de múltiplos órgãos.(PARKER; WATKINS, 2001)

Apesar de evidências de que a Endotoxina possa ter um papel importante na fisiopatologia da sepse existem críticas quanto ao seu uso em infusão como modelo de estudo da sepse. a) é provável que o uso de Endotoxina em altas doses em animais naturalmente mais resistentes tenha efeitos tóxicos não reconhecidos quando baixas doses são administradas em animais mais sensíveis como o homem. b) embora Endotoxina seja liberada em sepse causada por agentes Gram-negativos

ela não é liberada em sepse causada por agentes Gram-positivos, e a mortalidade destas infecções é similar. c) administração de corticosteróides e anti-Fator de Necrose Tumoral- α foram efetivas em modelos de endotoxemia, mas falharam em demonstrar benefício quando usadas em ensaios clínicos em humanos. d) foi demonstrado que a administração de *Escherichia coli* inativadas foi mais letal que Endotoxina. Outros componentes da parede celular bacteriana podem contribuir para a resposta inflamatória sistêmica.(FINK; HEARD, 1990)

1.1.2. Infusão ou instilação de bactérias exógenas

Alguns estudos avaliaram a resposta à administração direta de bactérias vivas na corrente sanguínea. A maioria destes utilizou altas doses de bactérias Gram-negativas aeróbicas, principalmente *Escherichia coli*. Há descrição de uma fase de aumento do débito cardíaco seguida de vasodilatação e choque.(PARKER; WATKINS, 2001) Há também a possibilidade de injetar as bactérias no peritônio.(D'ACÂMPORA, 1996) As vantagens propostas da administração de bactérias via peritoneal são a rápida dispersão do inóculo peritoneal por meio do movimento diafragmático e a rápida passagem da bactéria inoculada no peritônio para a circulação sistêmica. Podem ser usados inóculos poli ou monomicrobianos.

Apesar de ser um modelo reprodutível existem algumas desvantagens neste tipo de indução de sepse: a) necessidade de cultura e quantificação de bactérias previamente ao experimento; b) o modelo monomicrobiano não reflete a diversidade e combinação de agentes infecciosos que estão presentes na sepse humana; c) humanos não são desafiados com uma carga bacteriana maciça, mas tem um foco séptico que, intermitentemente e persistentemente, estimula o organismo com bactérias; d) variabilidade entre os estudos quanto a carga bacteriana, via de administração e cepa bacteriana.(DEJAGER et al.)

Uma variação deste método consiste na administração de fezes na cavidade peritoneal. Alguns autores estudaram cápsulas de gelatina com fezes da própria espécie(WEINSTEIN et al., 1974) ou fezes humanas(NICHOLS; SMITH; BALTHAZAR, 1978) inoculadas na cavidade peritoneal. Apesar de seu baixo custo, algumas desvantagens deste método como a impossibilidade de padronizar as espécies e cepas inoculadas e a resistência de alguns animais às próprias fezes fez com que este método caísse em desuso.(WICHTERMAN et al., 1980)

1.1.3. Alteração da barreira endógena protetora do animal

1.1.3.1. Ligadura e punção de ceco

Este modelo foi padronizado por Wichterman em 1980.(WICHTERMAN et al., 1980) Após anestesia, ratos ou camundongos são submetidos a laparotomia mediana e exposição do ceco. É realizada ligadura do ceco com fio de nylon 2-0 abaixo da válvula ileocecal e este é puncionado com uma agulha de calibre variável uma ou duas vezes. Após extravasamento de uma pequena quantidade de fezes, a cavidade peritoneal é fechada por planos, é realizada reposição volêmica via subdérmica com solução de cloreto de sódio 0,9% e o animal é devolvido à gaiola. (HUBBARD et al., 2005) Este modelo tem sido considerado o modelo padrão de estudo em pesquisas pré-clínicas envolvendo sepse por refletir melhor a complexidade da sepse humana.(DEJAGER et al.) Este modelo confere uma fonte de lesão tecidual (laparotomia), uma fonte de tecido necrosado (ceco) e uma fonte de infecção (peritonite), que evolui com translocação bacteriana, ativação da resposta inflamatória e eventualmente choque séptico.

As vantagens deste modelo de sepse experimental incluem a sua simplicidade técnica, origem polimicrobiana da sepse a partir de um foco infeccioso, utilizando o espectro completo das bactérias do hospedeiro, mimetização da progressão da sepse humana (fases hemodinâmicas e metabólicas similares e fases hiper e hipoinflamatórias) e liberação prolongada e baixa de citocinas (como nos seres humanos). Desvantagens descritas deste método incluem a dificuldade de padronização entre diferentes laboratórios, com fatores de variação que incluem idade, sexo e linhagem dos animais, e variações técnicas do experimento e evolução da peritonite em abscesso abdominal.(DEJAGER et al.)

1.1.3.2. Peritonite por *stent* no cólon ascendente

Neste modelo, após anestesia do animal e laparotomia mediana um *stent* de diâmetro padronizado é inserido cirurgicamente no cólon ascendente(ZANTL et al., 1998) o que promove um extravasamento contínuo de bactérias para a cavidade peritoneal. A gravidade e

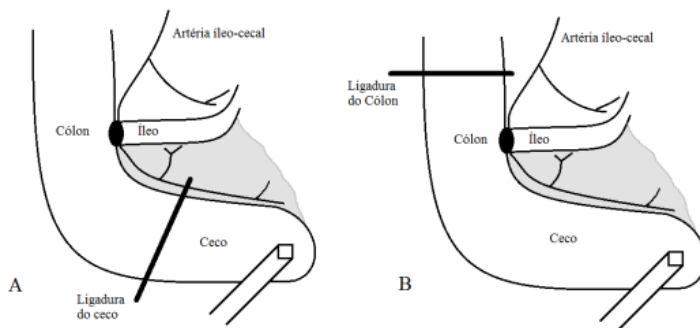
mortalidade deste modelo experimental também são diretamente proporcionais ao diâmetro do stent.

No entanto, parece que a resposta aguda hiperinflamatória sistêmica no modelo de sepse induzida por peritonite por *stent* no cólon ascendente é mais parecida com a forte resposta à endotoxemia, enquanto que as reações inflamatórias observadas no modelo de sepse induzida por ligadura e punção do ceco parecem-se mais com aqueles observados na sepse clínica.(MAIER et al., 2004)

Fatores que conhecidamente influenciam a mortalidade em modelos de sepse por ligadura e punção do ceco são: o calibre da agulha(EBONG et al., 1999), o número de perfurações(BAKER et al., 1983) e a extensão de ceco que foi ligado.(SINGLETON; WISCHMEYER, 2003) Estes fatores nem sempre estão presentes nas descrições nos procedimentos publicados, embora sejam os maiores determinantes de variabilidade do modelo de ligadura e punção do ceco.

D'Acampora propôs uma variação do modelo de sepse experimental de ligadura. Este modelo já foi utilizado em estudos no nosso meio.(BERNHARDT et al., 2007; D'ACAMPORA, ARMANDO JOSÉ et al., 2004; KESTERING et al., 2005; RUSSI, 2004) Neste modelo experimental, a perfuração com o agulha é realizada igualmente no ceco, porém a ligadura é realizada no colo ascendente (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática da diferença entre os modelos de sepse experimental propostos por Wichterman e d'Acampora. **A.** Modelo proposto por Wichterman, há ligadura do ceco. **B.** Modelo proposto por d'Acampora, há ligadura do colo ascendente. Em ambos os modelos o ceco é perfurado.



Fonte: o autor

1.1.4. Justificativa

Este estudo justifica-se pela necessidade de estimar a letalidade do novo modelo experimental que foi proposto em nosso meio. Este novo modelo precisa ser comparado ao modelo padrão quanto à variação de mortalidade dependendo do calibre da agulha utilizada. Após esta estimativa será possível analisar o impacto de possíveis modalidades terapêuticas na evolução da sepse experimental em ambos os modelos em diversas linhas de pesquisa, o que pode, um dia, vir a influenciar o tratamento de pacientes humanos gravemente enfermos.

2. OBJETIVO

Este estudo tem o objetivo de estimar a GL50 (Gauge Letal Mediano – Calibre Letal em 50% dos casos) de um novo modelo de sepe experimental e compará-lo ao GL50 do modelo padronizado por Wichterman.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostra

Foram utilizados ratos machos albinos da linhagem Wistar, espécie *Rattus norvegicus* (Rodentia, Mammalia), com idade aproximada de 180 dias e peso entre 300 e 400 gramas provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Os animais foram submetidos a um período de adaptação de 12 dias, no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental do Departamento de Clínica Cirúrgica da Universidade Federal de Santa Catarina (TOCE / UFSC), onde também foram realizados os procedimentos do experimento. Os animais foram acomodados, individualmente, até o procedimento experimental em gaiolas de plástico de 60 x 40 x 16 centímetros. Os mesmos foram mantidos com água e ração própria para a espécie, *ad libitum* e permaneceram acomodados à luz natural e temperatura ambiente. Foram observados os princípios éticos da experimentação animal propostos Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório (SBCAL), anteriormente denominada Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e MANUAL DE UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS/FIOCRUZ.

3.2. Subgrupos de animais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos.

Grupo Experimental I (GW_i): os animais foram submetidos a laparotomia e sepse experimental foi induzida segundo o modelo preconizado por Wichterman (WICHTERMAN et al., 1980) – ligadura e punção do ceco.

Grupo Experimental II (GdAc): os animais foram submetidos a laparotomia e sepse experimental foi induzida segundo o modelo proposto por d'Acampora – ligadura do cólon ascendente e punção do ceco.

3.3. Procedimentos

3.3.1. Anestesia

Os animais foram anestesiados para o procedimento cirúrgico. A anestesia foi realizada da seguinte maneira: os animais, já identificados e pesados, foram submetidos à anestesia geral com Tiletamina +

Zolazepam (Zoletil®), na dose de 20 mg intramuscular, repetidos se houvesse necessidade

O animal foi considerado anestesiado, quando houvesse perdido o reflexo córneo-palpebral e não exibia qualquer reação motora pela preensão com pinça do coxim adiposo do membro torácico.

3.3.2. Etapa cirúrgica

Os animais foram colocados em uma prancha de madeira de 30 por 35 cm, em decúbito dorsal, com os membros torácicos e pélvicos mantidos em abdução (Figura 2). Após tricotomia com aparelho elétrico de aproximadamente seis centímetros, foi realizada a anti-sepsia em toda a parede abdominal anterior com solução de iodo-povidona.

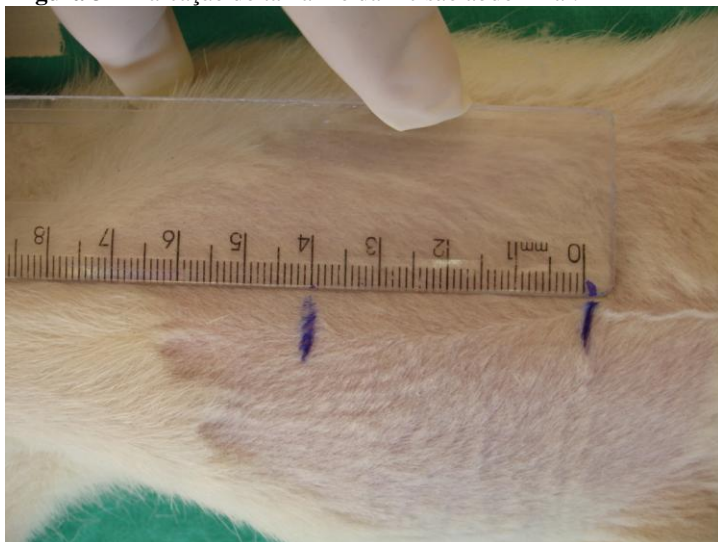
Figura 2 - Posição cirúrgica do animal anestesiado após tricotomia.



Fonte: o autor

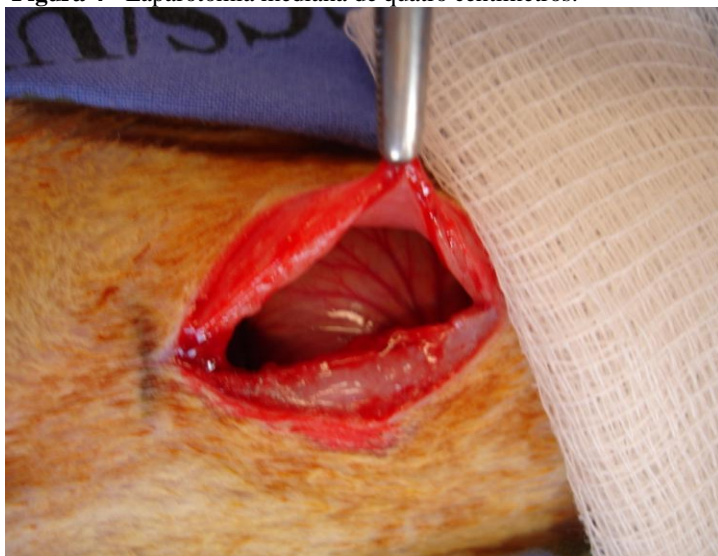
Todos os animais foram submetidos à laparotomia mediana de aproximadamente quatro centímetros (Figura 3 e 4). Foi realizado o inventário da cavidade peritoneal, sendo reconhecido e exposto o ceco com pinça romba, mantendo o restante do colo e o intestino delgado na cavidade peritoneal (Figura 4).

Figura 3 - Marcação do tamanho da incisão abdominal.



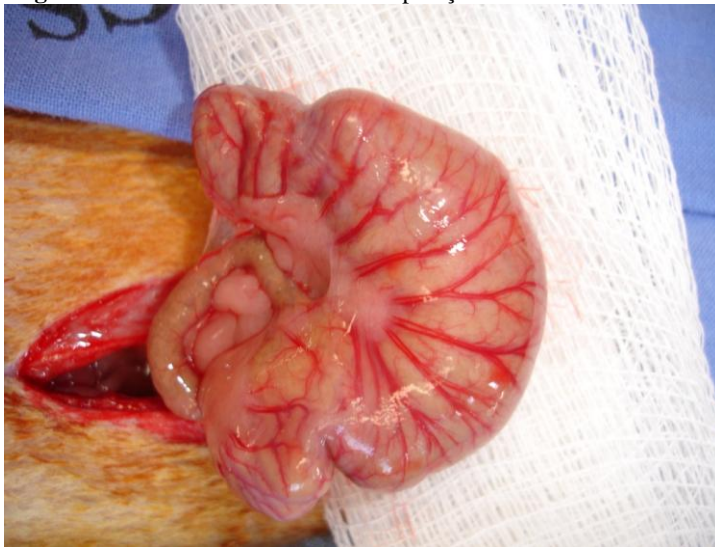
Fonte: o autor

Figura 4 - Laparotomia mediana de quatro centímetros.



Fonte: o autor

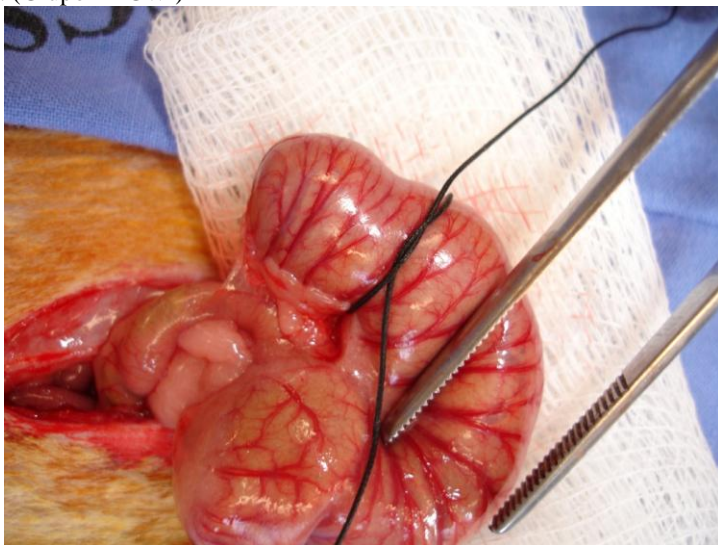
Figura 5 - Inventário da cavidade e exposição do ceco.



Fonte: o autor

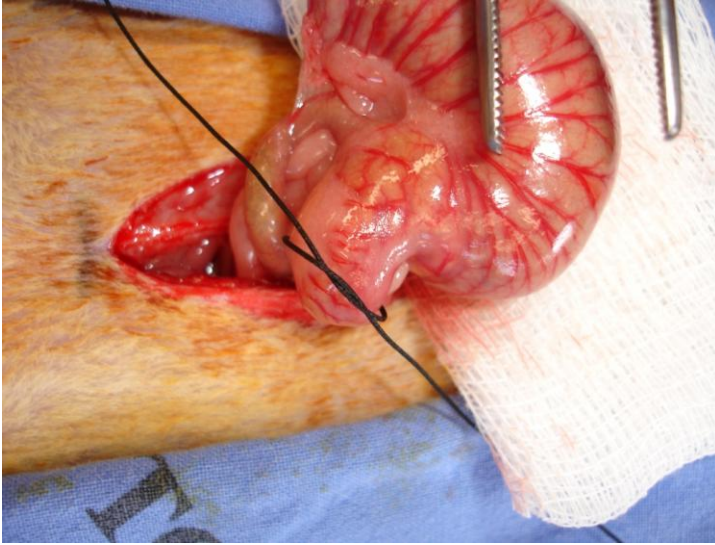
Nos animais alocados no grupo GWi procedeu-se à ligadura do ceco na porção média entre o coto cecal e a válvula ileocecal com fio de seda 3-0. Nos animais alocados no grupo GdAc, procedeu-se à ligadura do colo ascendente na sua porção mais proximal ao ceco com fio de seda 3-0. (Figuras 6 e 7)

Figura 6 - Local da ligadura com fio de seda 3-0 na porção média do ceco. (Grupo I – GWi)



Fonte: o autor

Figura 7 - Local da ligadura com fio de seda 3-0 na porção proximal do colo ascendente (Grupo II – GdAc).



Fonte: o autor

Em ambos os grupos foi realizada dupla perfuração em uma porção avascularizada do ceco com agulha de diâmetro variável conforme o protocolo (Figura 8). Após este procedimento, o mesmo foi devolvido à cavidade abdominal. Nessa ocasião foi marcado o dia e o horário da perfuração em uma folha de protocolo.

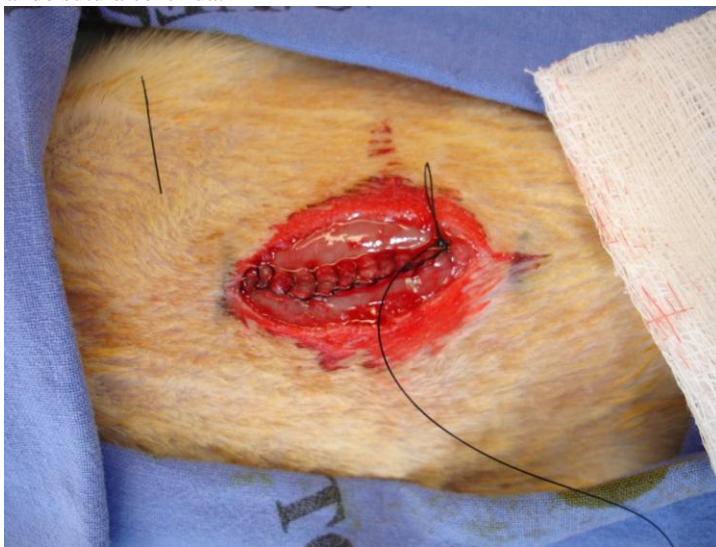
Figura 8 - Dupla perfuração com agulha 18G em porção avascularizada do ceco, em animal alocado no Grupo I (GWi)



Fonte: o autor

Realizou-se a síntese da parede abdominal com fio de náilon 5-0 em dois planos, com sutura contínua utilizando fio de nylon 3-0 (Figuras 9 e 10). Ao final da cirurgia, foram administrados cinco mililitros para cada 100 gramas de peso corporal de solução de cloreto de sódio 0,9% apirogênica em região subdérmica para prevenir desidratação. Após o procedimento de indução da peritonite experimental os animais foram colocados em gaiolas isoladas com acesso livre a água e alimentos próprios para a espécie onde foram acompanhados pelo período máximo de sete dias.

Figura 9 - Fechamento da parede abdominal com fio de nylon 3-0 utilizando sutura contínua.



Fonte: o autor

Figura 10 - Fechamento da derme e epiderme com fio de nylon 3-0 utilizando sutura contínua.



Fonte: o autor

3.4. Análise estatística

Para a determinação do calibre de agulha letal em 50% dos casos (GL50 em alegoria a DL50 – dose letal mediana) foi utilizada a metodologia proposta por Massey e Dixon, (DIXON, 1991) que consiste no método sequencial *up-and-down*. Este modelo foi escolhido por utilizar menos indivíduos para determinação da DL50 em relação aos métodos tradicionais. (LICHTMAN, 1998; LIPNICK et al., 1995)

O calibre inicial usado em ambos os grupos foi o 22G (devido a dados na literatura de que indicaram que o calibre 21G causa aproximadamente 50 % de mortalidade no modelo de Wichterman). (WALLEY et al., 1996) O desfecho de cada caso determinou o calibre da agulha a ser usada no experimento seguinte. Caso ocorresse o óbito do animal no período de observação (até sete dias), o calibre da agulha foi reduzido um degrau. Foram utilizadas agulhas de ponta tipo Quincke (tri-facetadas) para os experimentos. Caso o animal sobrevivesse ao período de observação, o calibre da agulha foi aumentado um degrau. Se algum animal estivesse moribundo durante o período de observação o mesmo seria submetido à eutanásia

por motivos éticos, através de anestesia por exaustão através de superdosagem de barbitúrico intraperitoneal (na dose de três vezes a dose anestésica convencional, ou seja, aproximadamente 120 mg/kg intraperitoneal), e seria considerado como se houvesse evoluído a óbito. Ao final do experimento animais eventualmente também sobreviventes serão submetidos à eutanásia pelo mesmo método e realizada necropsia.

Foi usada a escala *Standard Wire Gauge* para proporcionar aumento ou diminuição no calibre das agulhas, preferencialmente segundo o intervalo dos calibres pares da escala.

Os dados foram testados quanto à distribuição normal dos dados utilizando o teste de Shapiro-Wilk e que o desvio padrão da amostra esteja próximo ao intervalo entre os calibres. Foram respeitadas também as seguintes condições: o número de animais que evoluíram para óbito foi aproximadamente o mesmo número de animais que sobreviveram e o número de falhas em um nível não foi diferente mais de um do número de sucessos do nível imediatamente superior. Os critérios para interrupção dos testes foram: três animais sobrevivendo ao limite superior do calibre de agulha ou óbito após perfuração com o limite inferior de calibre de agulha; cinco reversões em seis animais consecutivos; número máximo de 15 animais em cada modelo.

Para o cálculo do GL50 foi utilizado o desfecho com menor número de ocorrências. Foi usada a seguinte fórmula:

$$GL50 = y' + \left(\frac{A}{N} \pm \frac{1}{2} \right) \quad (1)$$

Onde

$\mu = GL50$;

y' = gauge correspondente ao menor nível onde o evento menos freqüente ocorreu;

A = soma das contagens codificadas, dada pela fórmula:

$$A = \sum_{i=0}^k in_i \quad (2)$$

N = subtotal de desfechos com menor ocorrência

\pm usado mais quando for utilizado o desfecho óbito e menos quando for utilizado o desfecho sobrevivência.

Para o cálculo do intervalo de confiança 95% foi usado a seguinte fórmula:

$$GL50 \pm 1,96 \theta \quad (3)$$

Onde

σ = erro padrão da média, dado pela fórmula:

$$\sigma = \frac{Gs}{\sqrt{N}} \quad (4)$$

Onde

s = desvio padrão da amostra, dado pela fórmula

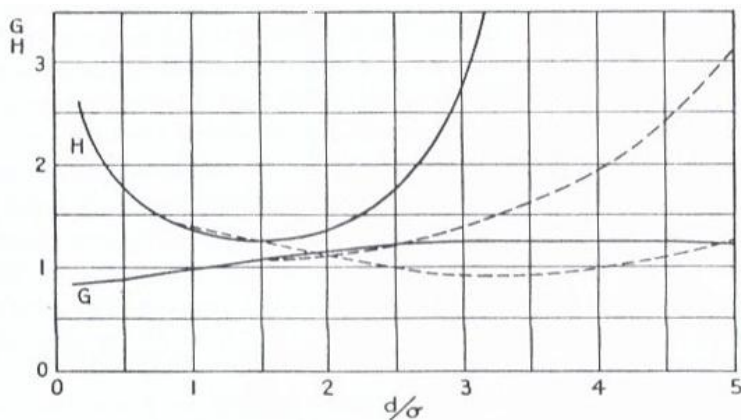
$$s = 1,620 d \left(\frac{NB - A^2}{N^2} + 0,029 \right) \quad (4)$$

Onde

B = soma dos quadrados das contagens codificadas, dada pela fórmula

$$B = \sum_{i=0}^k i^2 n_i \quad (5)$$

G = Fator de correção, extraído do gráfico abaixo em função de d/σ



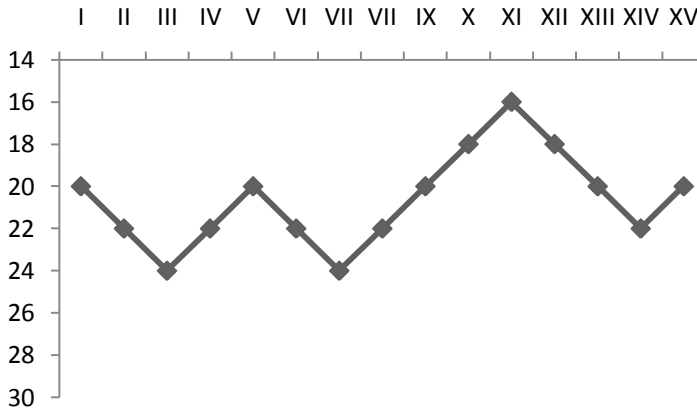
Para análise das diferenças entre variáveis quantitativas segundo grupos foi utilizado o teste t de *student*. Os dados foram testados quanto à distribuição normal usando o teste de Shapiro-Wilk. A análise estatística foi efetuada utilizando os programas Microsoft Office Excel 2007 e SPSS versão 17.0.

4. RESULTADOS

Foram incluídos no estudo 22 animais, na seguinte distribuição: quinze animais no Grupo I (GWi) e sete animais no Grupo II (GdAc). O peso médio dos animais do Grupo I (GWi) foi $355,3 \pm 45,7$ gramas, enquanto que o peso médio dos animais do Grupo II (GdAc) foi de $341,4 \pm 36,3$ gramas ($p > 0,42$).

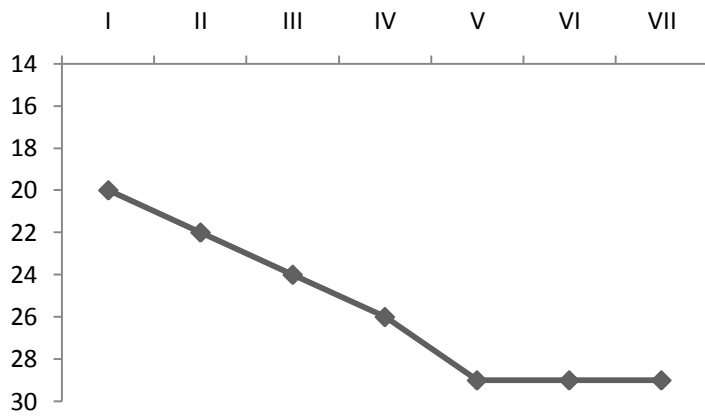
Os calibres de agulha utilizados nos nas cirurgias dos animais alocados no Grupo I (GWi) estão descritos na Figura 11. Os dados foram considerados distribuídos normalmente ($p < 0,24$). O GL50 neste grupo foi 19 G (Intervalo de Confiança 17 a 22).

Figura 11 - Calibres de agulha utilizados nos nas cirurgias dos animais alocados no Grupo I.



Os calibres de agulha utilizados no Grupo II (GdAc) estão descritos na Figura 12. Neste grupo não foi possível o cálculo do GL 50, pois houve óbito em todos os animais, inclusive em três animais submetidos ao limite inferior de calibre de agulha, causando interrupção do teste.

Figura 12 - Calibres de agulha utilizados nos nas cirurgias dos animais alocados no Grupo II.



5. DISCUSSÃO

O achado mais importante deste estudo foi que houve desfecho letal em todos os animais do Grupo II submetidos ao modelo experimental proposto por d'Acampora.

Modelos experimentais de doenças são essenciais para estudo da fisiopatologia da doença e de novas opções terapêuticas. No entanto, o desenvolvimento de modelos experimentais é complexo. Modelos experimentais para o estudo da peritonite têm sido propostos desde o final do século XIX.

Postulava-se, na época, que as bactérias envolvidas na peritonite migravam da cavidade peritoneal para a circulação sanguínea através do ducto torácico. Em 1898, Noetzel injetou *Streptococci* provenientes de uma vaca doente na cavidade peritoneal de coelhos e Porquinhos-da-Índia para verificar se a ligadura do ducto torácico alterava a evolução da peritonite. Ele conseguiu demonstrar que decorridos 10 minutos da injeção, já havia bacteremia. Ele também demonstrou que a *toilette* peritoneal aumentava a taxa de sobrevivência dos animais. Os animais do grupo experimental e do grupo que sofreu ligadura do ducto torácico tiveram taxas semelhantes de sobrevivência.(NOETZEL, 1898)

Constain, em 1922, também descreveu um estudo sobre a ligadura do ducto torácico em cães, porém utilizou outra abordagem. Ele realizou uma ligadura dupla do apêndice e mesoapêndice utilizando fio catagute cromado e devolveu-o à cavidade peritoneal. Em uma série de sete animais todos evoluíram a óbito em 48 horas e na necropsia foram achados apêndice roto gangrenado e exsudato sanguinolento na cavidade. Em outra série de sete animais, houve aumento da sobrevivência dos animais nos quais o ducto torácico foi ligado.(CONSTAIN, 1922)

Apesar de relatos de modelo experimentais de sepse envolvendo a ligadura e punção do ceco na década de 1930(STEINBERG, 1926), os modelos de ligadura e isquemia do apêndice/ceco ou injeção intraperitoneal de bactérias foram os mais utilizados nas pesquisas até 1980, quando Wichterman padronizou o modelo de ligadura e punção do ceco em roedores. A vantagem da punção do ceco é criar uma latência da doença mais previsível do que aguardar a rotura espontânea do coto.

O porco é mais semelhante ao homem do que o cão em muitos aspectos.(WICHTERMAN et al., 1980) No entanto, a pesquisa

utilizando animais maiores tem maior custo e dificuldades técnicas e de logística. Outras espécies que já foram utilizadas em modelos incluem coelhos e ovelhas.(FINK; HEARD, 1990) Alguns estudos sobre primatas não humanos esbarram em preocupação com o bem-estar do animal e necessidade de criação de ambiente similar a Unidade de Terapia Intensiva (UTI) para realizar os experimentos.(HANGEN et al., 1989) Apesar do menor custo, facilidade de manuseio e possibilidade de manipulação genética, animais de pequeno porte não toleram bem coletas de sangue para análise ou monitorização invasiva.(RITTIRSCH; HOESEL; WARD, 2007) A maioria das pesquisas, no entanto, utiliza roedores de pequeno porte para estudos experimentais da sepse.(WICHTERMAN et al., 1980)

Modelos experimentais de sepse não refletem perfeitamente a doença ou a evolução desta em seres humanos.(DEITCH, 1998) As diferenças e fatores de variação são muitos. Pode haver muita heterogeneidade entre diferentes laboratórios em relação à padronização técnica. Em geral animais usados são jovens, saudáveis, com contagem de leucócitos normal e sem co-morbididades (como doença cardiovascular, diabetes, câncer, imunossupressão entre outras). Além disto, o tempo quando é iniciado o tratamento, os tipos e regimes de antibioticoterapia, ventilação mecânica e suporte inotrópico diferem muito do que é oferecido aos animais. Outras situações como o ambiente "limpo" do hospital em relação ao ambiente "sujo" da gaiola, e o fato de certos animais praticarem colprofagia são limitações conhecidas dos estudos experimentais.(ESMON, 2004) Outra faceta da questão é a grande variabilidade de hábitos, estado nutricional e meio ambiente dos pacientes humanos gravemente enfermos em relação a população de animais de laboratório. Pacientes humanos também recebem tratamentos radicalmente heterogêneos por vezes em momentos diferentes da evolução da doença.(DELLINGER et al., 2008)

A apendicite era causa de grande preocupação antes do desenvolvimento do tratamento cirúrgico da peritonite. A mortalidade devido a esta condição era praticamente 100% no século XIX.(HAU, 2000) O desenvolvimento das técnicas cirúrgico-anestésicas e o avanço do conhecimento reduziram esta taxa para a faixa de 0,07 a 2,4 a cada 1.000 cirurgias, dependendo da idade, estágio de evolução e condições clínicas do paciente.(BLOMQVIST et al., 2001) O modelo de ligadura e punção do ceco visa simular um caso de abdome agudo inflamatório

causado por apendicite, enquanto que no modelo em estudo há simulação de um quadro obstrutivo do colo (*e.g.* tumor ou volvo) complicado por perfuração. Já em 1968, Clowes(CLOWES et al., 1968) defendia a manutenção da permeabilidade do trato digestivo como necessária em modelos de estudo de sepse no cão.

Pode-se especular que a obstrução da luz intestinal tenha sido a responsável pelo óbito dos animais do Grupo II (GdAc). A fisiopatologia da obstrução intestinal é conhecida. Ar e líquidos deglutidos acumulam-se a montante da obstrução, predispondo a multiplicação bacteriana. Este fato leva a aumento na produção de gases, o que piora o processo e maior susceptibilidade a complicações sistêmicas pela translocação bacteriana. Se o processo não se resolve, há perda da capacidade absorptiva do intestino e há movimentação de fluidos para a luz intestinal. Tais acontecimentos causam o desenvolvimento de estado de choque e distúrbios eletrolíticos. Há ainda diminuição do suprimento de sangue ao intestino, favorecendo necrose e perfuração.(KAHI; REX, 2003)

Em ratos, Wichterman encontrou uma letalidade de 90%(WICHTERMAN et al., 1980) com o calibre 18 G em modelo de dupla perfuração e de 77% com o calibre 22G ao quinto dia pós-experimento. Também foi reportado no mesmo estudo que a mortalidade após o quinto dia de estudo é rara.(WICHTERMAN et al., 1980) Outro estudo(RITTIRSCH et al., 2009), que comparou a distância de ceco ligada na mortalidade do modelo, referiu que a ligadura na porção média do ceco promovia uma letalidade de 50% com o calibre 18 G 50% ao sétimo dia. Certa variação também existe em camundongos, havendo autores(WALLEY et al., 1996) que encontraram um GL50 de 21G enquanto que outros encontraram um valor próximo a 18G.(MAIER et al., 2004) O valor encontrado em nosso estudo na espécie RN está dentro da variação reportada por estes autores. Há certa variação entre diferentes estudos, porém em limites razoáveis, o que faz com que o método de ligadura e punção do ceco seja considerado reprodutível dentro de suas limitações.(DEJAGER et al.)

Neste estudo o único desfecho analisado foi o dualismo: óbito x sobrevivência. Embora esta abordagem pareça simplista ela dá importância ao desfecho que mais importa ao paciente e seus familiares quando alguém é confrontado com uma doença grave potencialmente fatal: sobrevivência em longo prazo.(REED et al., 2004) Outro ponto

que mais recentemente foi considerado como fundamental, dentro contexto moderno de saúde proposto pela Organização Mundial de Saúde (*Saúde é o perfeito bem-estar físico, mental e social e não apenas a ausência de doença*), em concordância com os avanços da bioética, foi agregar à sobrevida o conceito de qualidade de vida como um desfecho que importa.(KHEIR et al., 2004) Desfecho em pesquisas de saúde devem incluir: a percepção de saúde, medidas de atividades funcionais, medidas baseadas em preferência pessoal do paciente e satisfação do paciente.(CLANCY; EISENBERG, 1998) Este modelo de atenção à saúde difere do antigo modelo biomédico no qual o estado de saúde consistia em manter variáveis biológicas em faixas de valores ditos normais e era medida por marcadores biológicos. Especificamente no contexto de sepse, um estudo notou que já foram utilizados 178 biomarcadores. Dentre estes marcadores, 18 foram estudados apenas em estudos experimentais, 58 em estudos experimentais e clínicos, 101 apenas em estudos clínicos e 34 foram estudados no diagnóstico de sepse. O estudo reportou que biomarcadores tem potencial limitado de distinguir sepse de outras condições inflamatórias ou prever desfechos.(PIERRAKOS; VINCENT, 2010)

Modelos experimentais que levam a óbito após 6 a 12 horas não refletem bem este desfecho em humanos.(PIPER et al., 1996) Deve haver tempo suficiente de evolução da síndrome antes do óbito para que as manifestações de sepse possam ser estudadas. Uma taxa razoável de sobrevida ao modelo também é necessária. Lesões muito graves podem impedir o aparecimento dos sinais de sepse antes do óbito ou impedir que uma modalidade terapêutica efetiva tenha sucesso em promover uma maior taxa de sobrevivência. O modelo que foi avaliado neste ensaio tem letalidade muito alta. Futuras pesquisas são necessárias para estabelecer o papel do modelo "**Obstrução e Perfuração Intestinal**" nos estudos sobre a fisiopatologia e tratamento da sepse e da obstrução intestinal.

6. CONCLUSÕES

O GL50 no modelo de Wichterman é o calibre 19G.

O GL 50 no modelo de d'Acampora não pode ser calculado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANGUS, D. C. et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. **Crit Care Med**, v. 29, n. 7, p. 1303-10, Jul 2001.

ANGUS, D. C.; WAX, R. S. Epidemiology of sepsis: an update. **Crit Care Med**, v. 29, n. 7 Suppl, p. S109-16, Jul 2001.

BAKER, C. C. et al. Evaluation of factors affecting mortality rate after sepsis in a murine cecal ligation and puncture model. **Surgery**, v. 94, n. 2, p. 331-5, Aug 1983.

BARRAUD, D.; GIBOT, S. Sepsis et choc septique. **Rev Francoph Laborat**, v. 37, n. 389, p. 29-36, 2007.

BERNHARDT, J. A. et al. Effect of post-natal castration on sepsis mortality in rats. **Acta Cir Bras**, v. 22, n. 1, p. 22-9, Jan-Feb 2007.

BLOMQUIST, P. G. et al. Mortality after appendectomy in Sweden, 1987-1996. **Ann Surg**, v. 233, n. 4, p. 455-60, Apr 2001.

BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1644-55, Jun 1992.

BONE, R. C.; GRODZIN, C. J.; BALK, R. A. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. **Chest**, v. 112, n. 1, p. 235-43, Jul 1997.

BURAS, J. A.; HOLZMANN, B.; SITKOVSKY, M. Animal models of sepsis: setting the stage. **Nat Rev Drug Discov**, v. 4, n. 10, p. 854-65, Oct 2005.

CLANCY, C. M.; EISENBERG, J. M. Outcomes research: measuring the end results of health care. **Science**, v. 282, n. 5387, p. 245-6, Oct 9 1998.

CLOWES, G. H., JR. et al. Observations on the pathogenesis of the pneumonitis associated with severe infections in other parts of the body. **Ann Surg**, v. 167, n. 5, p. 630-50, May 1968.

CONSTAIN, W. A. Septic absorption in diffuse septic peritonitis. **Canad Med Assoc J**, v. 12, p. 789-792, 1922.

D'ACAMPORA, A. J. et al. Efeitos da castração pós-natal sobre o tecido pulmonar após sepse experimental de origem abdominal em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, p. 115-119, 2004.

_____. Is animal experimentation fundamental? **Acta Cir Bras**, v. 24, n. 5, p. 423-5, Sep-Oct 2009.

D'ACÂMPORA, A. J. **Modelo de sepse experimental em ratos: estudo clínico e histológico**. 1996. Dissertação, Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

DEITCH, E. A. Animal models of sepsis and shock: a review and lessons learned. **Shock**, v. 9, n. 1, p. 1-11, Jan 1998.

DEJAGER, L. et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends Microbiol**, v. 19, n. 4, p. 198-208, Apr 2011.

DELLINGER, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. **Intensive Care Med**, v. 34, n. 1, p. 17-60, Jan 2008.

DIXON, W. J. Staircase bioassay: the up-and-down method. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 15, n. 1, p. 47-50, Spring 1991.

DOI, K. et al. Animal models of sepsis and sepsis-induced kidney injury. **J Clin Invest**, v. 119, n. 10, p. 2868-78, Oct 2009.

EBONG, S. et al. Immunopathologic alterations in murine models of sepsis of increasing severity. **Infect Immun**, v. 67, n. 12, p. 6603-10, Dec 1999.

ESMON, C. T. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? **Crit Care Med**, v. 32, n. 5 Suppl, p. S219-22, May 2004.

FINK, M. P.; HEARD, S. O. Laboratory models of sepsis and septic shock. **J Surg Res**, v. 49, n. 2, p. 186-96, Aug 1990.

GARRIDO, A. G.; FIGUEIREDO, L. F. P. D.; SILVA, M. R. E. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. **Acta Cir Bras**, v. 19, n. 2, p. 82-88, 2004.

HANGEN, D. H. et al. Complement levels in septic primates treated with anti-C5a antibodies. **J Surg Res**, v. 46, n. 3, p. 195-9, Mar 1989.

HAU, T. The history of peritonitis. **Acta Chir Austriaca**, v. 32, n. 4, p. 157-161, 2000.

HOTCHKISS, R. S.; KARL, I. E. The pathophysiology and treatment of sepsis. **N Engl J Med**, v. 348, n. 2, p. 138-50, Jan 9 2003.

HUBBARD, W. J. et al. Cecal ligation and puncture. **Shock**, v. 24 Suppl 1, p. 52-7, Dec 2005.

KAHI, C. J.; REX, D. K. Bowel obstruction and pseudo-obstruction. **Gastroenterol Clin North Am**, v. 32, n. 4, p. 1229-47, Dec 2003.

KESTERING, D. D. M. et al. [Rats resistance to fecal peritonitis when subjected to total splenectomy and auto-implant of the spleen in the retroperitoneum]. **Acta Cir Bras**, v. 20, n. 6, p. 473-7, Nov-Dec 2005.

KHEIR, N. M. et al. Health-related quality of life measurement in pharmaceutical care. Targeting an outcome that matters. **Pharm World Sci**, v. 26, n. 3, p. 125-8, Jun 2004.

LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Crit Care Med**, v. 31, n. 4, p. 1250-6, Apr 2003.

LICHTMAN, A. H. The up-and-down method substantially reduces the number of animals required to determine antinociceptive ED50 values. **J Pharmacol Toxicol Methods**, v. 40, n. 2, p. 81-5, Aug 1998.

LIPNICK, R. L. et al. Comparison of the up-and-down, conventional LD50, and fixed-dose acute toxicity procedures. **Food Chem Toxicol**, v. 33, n. 3, p. 223-31, Mar 1995.

MACHADO, F. O. Medicina baseada em consciência social. **Rev BrasTer Intensiva**, v. 19, n. 3, p. 279-280, 2007.

MAIER, S. et al. Cecal ligation and puncture versus colon ascendens stent peritonitis: two distinct animal models for polymicrobial sepsis. **Shock**, v. 21, n. 6, p. 505-11, Jun 2004.

NICHOLS, R. L.; SMITH, J. W.; BALTHAZAR, E. R. Peritonitis and intraabdominal abscess: an experimental model for the evaluation of human disease. **J Surg Res**, v. 25, n. 2, p. 129-34, Aug 1978.

NOETZEL, W. Ueber peritoneale Resorption und Infection. **Arch Klin Chir**, v. 57, p. 311-321, 1898.

PARKER, S. J.; WATKINS, P. E. Experimental models of gram-negative sepsis. **Br J Surg**, v. 88, n. 1, p. 22-30, Jan 2001.

PIERRAKOS, C.; VINCENT, J. L. Sepsis biomarkers: a review. **Crit Care**, v. 14, n. 1, p. R15, 2010.

PIPER, R. D. et al. Introducing Critical Appraisal to studies of animal models investigating novel therapies in sepsis. **Crit Care Med**, v. 24, n. 12, p. 2059-70, Dec 1996.

REED, M. F. et al. Survival after resection for lung cancer is the outcome that matters. **Am J Surg**, v. 188, n. 5, p. 598-602, Nov 2004.

RITTIRSCH, D.; HOESEL, L. M.; WARD, P. A. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. **J Leukoc Biol**, v. 81, n. 1, p. 137-43, Jan 2007.

RITTIRSCH, D. et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nat Protoc**, v. 4, n. 1, p. 31-6, 2009.

RUSSI, R. F. **Estudo Comparativo da celularidade da reação inflamatória aguda na serosa e mesentério intestinais às telas de poliamida e polipropileno em ratos wistar com peritonite fecal por**

técnica morfométrica. 2004. Dissertação, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SALES JR, J. A. L. et al. Sepsis Brasil: 11. estudo epidemiológico da sepsis em unidades e terapia intensiva brasileiras. **Rev BrasTer Intensiva**, v. 18, p. 9-17, 2006.

SINGLETON, K. D.; WISCHMEYER, P. E. Distance of cecum ligated influences mortality, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression following cecal ligation and puncture in the rat. **Eur Surg Res**, v. 35, n. 6, p. 486-91, Nov-Dec 2003.

SPRUNG, C. L. et al. Hydrocortisone therapy for patients with septic shock. **N Engl J Med**, v. 358, n. 2, p. 111-24, Jan 10 2008.

STEINBERG, B. Experimental Production of General Peritonitis: With an Anatomic Study. **Am J Pathol**, v. 2, n. 5, p. 415-420 5, Sep 1926.

TREACHER, D. F.; BROWN, K. A. The Basic science of sepsis. **Surgery**, v. 27, n. 11, p. 465-469, 2009.

WALLEY, K. R. et al. Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. **Infect Immun**, v. 64, n. 11, p. 4733-8, Nov 1996.

WEINSTEIN, W. M. et al. Experimental intra-abdominal abscesses in rats: development of an experimental model. **Infect Immun**, v. 10, n. 6, p. 1250-5, Dec 1974.

WICHTERMAN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H. Sepsis and septic shock--a review of laboratory models and a proposal. **J Surg Res**, v. 29, n. 2, p. 189-201, Aug 1980.

YANG, H. et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 1, p. 296-301, Jan 6 2004.

ZANTL, N. et al. Essential role of gamma interferon in survival of colon ascendens stent peritonitis, a novel murine model of abdominal sepsis. **Infect Immun**, v. 66, n. 5, p. 2300-9, May 1998.