

Efeito da Lavagem Peritoneal com Bupivacaína na Sobrevida de Ratos com Peritonite Fecal*

Effects of Peritoneal Lavage with Bupivacaine on Survival of Mice with Fecal Peritonitis

Marcos Célio Brocco, TSA¹, Danilo Nagib Salomão Paulo², João Florêncio de Abreu Baptista³, Antônio Roberto Carraretto, TSA⁴, Thiago Antunes Ferrari⁵, Thiago Caetano V. de Azevedo⁵, Alcino Lázaro da Silva⁶

RESUMO

Brocco MC, Paulo DNS, Baptista JFA, Carraretto AR, Ferrari TA, Azevedo TCV, Silva AL — Efeito da Lavagem Peritoneal com Bupivacaína na Sobrevida de Ratos com Peritonite Fecal.

JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS: Com base nos conhecimentos sobre a ação antiinflamatória e antibacteriana dos anestésicos locais (AL) o estudo teve como objetivo determinar o efeito da lavagem peritoneal com solução de bupivacaína na sobrevida de ratos com peritonite fecal por fezes autógenas.

MÉTODO: Foram utilizados 48 ratos da linhagem Wistar, com peso entre 300 g e 330 g ($311,45 \pm 9,67$), submetidos à laparotomia seis horas após a indução de peritonite, distribuídos aleatoriamente em quatro grupos: 1 – Controle, nenhum tratamento ($n = 12$); 2 – Enxugamento da cavidade abdominal ($n = 12$); 3 – Lavagem da cavidade abdominal com 3 mL de solução fisiológica a 0,9% e enxugamento ($n = 12$); 4 – Lavagem da cavidade abdominal com 8 mg.kg⁻¹ ($\pm 0,5$ mL) de bupivacaína 0,5%, adicionada a 2,5 mL de solução fisiológica a 0,9% e enxugamento ($n = 12$). Os animais que faleceram foram necropsiados e o horário do óbito foi anotado. Os animais sobreviventes foram mortos no 11^o dia do pós-operatório e realizou-se a necropsia.

RESULTADOS: Houve 100% de mortalidade nos animais do Grupo 1, em 52 horas, 100% nos animais do Grupo 2, em 126 horas e 50% nos animais do Grupo 3 em 50 horas. Os animais do Grupo 4 sobreviveram. A sobrevida, no 11^o dia de pós-operatório, foi maior nos grupos 3 e 4 com relação aos grupos 1 e 2 ($p < 0,001$) e maior nos Grupo 4 com relação ao Grupo 3 ($p < 0,01$).

CONCLUSÕES: A lavagem peritoneal com solução de bupivacaína diluída em solução fisiológica foi eficaz para evitar o óbito, por 11 dias, em 100% dos animais com peritonite fecal.

Unitermos: ANESTÉSICO, Local: bupivacaína; ANIMAIS: ratos; COMPLICAÇÕES, Infecção: peritonite.

SUMMARY

Brocco MC, Paulo DNS, Baptista JFA, Carraretto AR, Ferrari TA, Azevedo TCV, Silva AL — Effects of Peritoneal Lavage with Bupivacaine on Survival of Mice with Fecal Peritonitis.

BACKGROUND AND OBJECTIVES: Based on the knowledge of the anti-inflammatory and anti-bacterial actions of local anesthetics (LA), the objective of this study was to determine the effects of peritoneal lavage with bupivacaine on survival of mice with fecal peritonitis.

METHODS: Forty-eight Wistar mice, weighing between 300 and 330 g (311.45 ± 9.67 g), undergoing laparotomy 6 hours after induction of peritonitis were randomly divided in 4 groups: 1 – Control, without treatment ($n = 12$); 2 – Drying of the abdominal cavity ($n = 12$); 3 – Lavage with 3 mL NS and posterior drying of the abdominal cavity ($n = 12$); and 4 – Lavage with 8 mg.kg⁻¹ (± 0.5 mL) of 0.5% bupivacaine added to 2.5 mL of NS followed by drying out of the abdominal cavity ($n = 12$). Animals that died underwent necropsy and the time of death was recorded. Surviving animals were killed on the 11th postoperative day and underwent necropsy.

RESULTS: Group 1 presented a 100% mortality rate in 52 hours, 100% mortality rate in Group 2 in 126 hours, and Group 3 presented a 50% mortality rate in 50 hours. Animals in Group 4 survived. Survival on the 11th day was greater in groups 3 and 4 than in Groups 1 and 2 ($p < 0.001$) and greater in Group 4 than in Group 3 ($p < 0.01$).

CONCLUSIONS: Peritoneal lavage with a solution of bupivacaine diluted in NS was effective in preventing death for 11 days in 100% of animals with fecal peritonitis.

Key Words: ANESTHETIC, Local: bupivacaine; ANIMALS: mice; COMPLICATIONS, Infection: peritonitis.

*Recebido da (Received from) Escola de Medicina da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM) e Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), Vitória, ES

1. Professor Adjunto IV de Anestesiologia da UFES; Mestrando em Cirurgia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)
2. Professor Titular de Cirurgia da EMESCAM
3. Professor Adjunto IV de Anestesiologia da UFES, Mestre em Cirurgia pela UFMG; Anestesiologista do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes – Vitória, ES
4. Professor de Anestesiologia da UFES, Mestre em Anestesiologia pela Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP; Responsável CET Integrado HUCAM-HAFPEs
5. Estudante do 10^o período do Curso de Medicina da EMESCAM
6. Professor Emérito de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFMG

Apresentado (Submitted) em 16 de março de 2008
Aceito (Accepted) para publicação em 23 de junho de 2008

Endereço para correspondência (Correspondence to):
Dr. Marcos Célio Brocco
Rua Pedro Luis Zanandréa, 55 — Mata da Praia
29065-610 Vitória, ES
E-mail: mcbrocco@unimedvitória.com.br

© Sociedade Brasileira de Anestesiologia, 2008

INTRODUÇÃO

Apesar de todos os avanços no tratamento da peritonite não houve, nas duas últimas décadas, diminuição da mortalidade por essa doença¹. A mortalidade aumenta quando ocorre disfunção de múltiplos órgãos e sistemas. Essa disfunção, embora não tenha patogenia bem elucidada, parece ser decorrente de processo inflamatório complexo. A resposta séptica é associada à liberação de citocinas antiinflamatórias e inflamatórias²⁻⁴ com subsequente ativação dos leucócitos, complemento e da cascata da coagulação⁵, além da produção de anticorpos e da destruição bacteriana por polimorfonucleares⁶. Os mediadores, como TNF-alfa, interleucinas (IL-1 beta, IL-6 e IL-8) e óxido nítrico (NO), desempenham papéis fundamentais na sepse e os mediadores antiinflamatórios estão presentes concomitantemente modulando os efeitos e a liberação dos mediadores inflamatórios⁷.

Os anestésicos locais têm se mostrado eficazes para modular a cascata inflamatória na isquemia e reperfusão do coração^{8,9}, do pulmão^{10,11} e do fígado^{12,13}. São capazes de exercer efeito antiinflamatório em vários tipos de células, incluindo monócitos, macrófagos e neutrófilos¹⁴. A ropivacaína diminuiu a resposta inflamatória pulmonar que foi provocada por lipopolissacarídeo em ratos¹⁵. A lidocaína a 1% e a bupivacaína a 0,5% mostraram-se eficazes na prevenção da peritonite induzida por ácido clorídrico a 0,1 M, com relação à solução fisiológica a 0,9%¹⁶. Camundongos com peritonite séptica induzida segundo modelo experimental¹⁷, tratados com lidocaína a 5% e a 10% e bupivacaína a 1% e a 2%, por via subcutânea, com bomba de infusão, apresentaram diminuição da mortalidade e proteção contra disfunções hepáticas e renais, por atenuar a resposta hiperinflamatória¹⁸. Além disso, alguns anestésicos apresentam efeito bactericida contra algumas bactérias *in vitro*^{19,20}. Com base nesses estudos questionou-se se a aplicação intraperitoneal de anestésico local poderia interferir na sobrevivência de animais com peritonite. Realizou-se o presente estudo com o objetivo de verificar os efeitos de solução de bupivacaína aplicada na cavidade abdominal em ratos com peritonite fecal induzida.

MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), de acordo com o protocolo nº 144/06 (COEP-CETEA).

Foram utilizados 48 ratos pertencentes à linhagem Wistar, com peso entre 300 g e 330 g ($311,45 \pm 9,67$), provenientes do Biotério da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, ES (EMESCAM).

Os animais foram anestesiados com cloridrato de S(+) cetamina 12,5 mg.kg⁻¹, submetidos à punção abdominal com cateter calibre 16G, no quadrante inferior esquerdo do abdo-

me e pesados em balança eletrônica, com sensibilidade de 1 g. A peritonite foi induzida pela injeção, na cavidade abdominal, de 5 mL.kg⁻¹ de peso, da suspensão que foi preparada com 2 g de fezes recém-defecadas diluída em 17 mL de solução de cloreto de sódio a 0,9% (solução salina) e filtrada em compressa de gaze, a fim de permitir a sua livre passagem pelo interior da agulha. Seis horas após a indução da peritonite, os ratos foram anestesiados com uma mistura de cloridrato de xilazina 2,5 mg.kg⁻¹ com cloridrato de S(+) cetamina 25 mg.kg⁻¹ e submetidos à laparotomia mediana com cerca de 2 cm de comprimento, exame da cavidade, colheita de 0,5 mL da secreção para bacterioscopia, cultura e antibiograma. Nessa ocasião, foram distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (Tabela I).

No Grupo 3 foram aplicados 3 mL de solução fisiológica a 0,9%. No Grupo 4 foi aplicada uma solução contendo 8 mg.kg⁻¹ de bupivacaína a 0,5% ($\pm 0,5$ mL) adicionada a 2,5 mL de solução fisiológica a 0,9%, com um volume de cerca de 3 mL.

Nos grupos 3 e 4, a solução fisiológica, com ou sem anestésico, foi deixada por três minutos na cavidade. Nesse período, a solução foi manipulada cuidadosamente entre as vísceras abdominais para permitir um maior contato com o peritônio. A seguir, o líquido peritoneal foi enxugado com compressa de gaze para retirar a maior quantidade possível. A parede abdominal foi suturada em dois planos com fio de náilon monofilamento, de espessura 4-0, em chuleio simples. Foi suturado o plano musculoponeurótico seguido da pele. No pós-operatório todos os animais foram hidratados com 10 mL de solução fisiológica a 0,9% em dose única, por via subcutânea, a cada 24 horas, por dois dias. A analgesia foi feita com cloridrato de nalbufina 0,1 mg.kg⁻¹, por via subcutânea, de oito em oito horas, por dois dias.

Os animais que foram ao óbito foram necropsiados e o horário do óbito foi anotado. Os animais sobreviventes foram mortos no 11º dia de pós-operatório, para estudo, com a injeção 50 mg.kg⁻¹ de pentobarbital sódico na cavidade abdominal. Nessa ocasião, foram examinadas a cavidade abdominal, as possíveis aderências e focos de infecção, com colheita de secreção para estudo bacteriológico. As aderências foram classificadas em seis graus²¹ (Tabela II).

Tabela I – Procedimentos Realizados nos Diferentes Grupos

Grupo	Procedimento Realizado
1 (n = 12)	Nenhum tratamento
2 (n = 12)	Enxugamento da cavidade abdominal
3 (n = 12)	Lavagem da cavidade abdominal com 3 mL de solução fisiológica a 0,9% e enxugamento
4 (n = 12)	Lavagem da cavidade abdominal com 8 mg.kg ⁻¹ ($\pm 0,5$ mL) de bupivacaína 0,5%, sem adrenalina, e 2,5 mL de solução fisiológica a 0,9% e enxugamento

Tabela II – Classificação das Aderências

Grau 0	Ausência
Grau 1	Número reduzido, de caráter fibrinoso, facilmente desfeitas pela manipulação
Grau 2	Firmes, resistentes à manipulação, entre alças intestinais, porém não envolvendo a parede abdominal
Grau 3	Firmes, resistentes à manipulação, entre a parede abdominal e um órgão ou estrutura
Grau 4	Firmes, resistentes à manipulação, entre a parede abdominal e mais de um órgão ou estrutura
Grau 5	Firmes, resistentes à manipulação, entre alças e entre alças e a parede abdominal com fístula entérica

Modificado de Diogo-Filho A, Lazarini BCM, Vieira-Junior F et al.²¹

Foram analisados a média de sobrevivência, o número de sobreviventes de cada grupo e a curva de sobrevivência. Para isso, foram utilizados testes estatísticos não-paramétricos, visando a comparar o tempo de sobrevivência (teste *t* de Student para amostras independentes), o número de sobreviventes (teste exato de Fischer), a curva de sobrevida de Kaplan Méier com o teste de Log-Rank. Foi considerado significativo o valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

A laparotomia, realizada seis horas após punção abdominal e a injeção de solução de fezes recém-defecadas, mostrou

edema, hiperemia entre as alças e secreção com aspecto purulento na cavidade abdominal.

As bactérias isoladas do líquido peritoneal por ocasião da laparotomia foram: *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus*, *Proteus penneri*, *Enterococcus gallinarum*, *Staphylococcus sciuri*, *Bacillus species*, *Staphylococcus epidermidis*, *Aerococcus viridans*. A sensibilidade dessas bactérias aos antibióticos pode ser observada no Quadro I.

Os ratos que sobreviveram no pós-operatório apresentavam-se dinâmicos e ingeriam alimentos líquidos e os exames das cavidades abdominais mostraram aderências de 2º e 3º graus. Os ratos que faleceram estavam adinâmicos, com piloereção, com halo escuro em torno dos olhos, taquipnéicos e anoréticos. O exame da cavidade abdominal mostrou pouca secreção purulenta e aderências frouxas entre as alças intestinais que foram consideradas de graus 0 e 1 (Tabela II).

A sobrevida dos animais foi mais freqüente no Grupo 4 com relação ao Grupo 3 ($p < 0,01$) e aos grupos 2 e 1 ($p < 0,001$) (Tabela III).

A curva de sobrevida mostra que houve 100% de mortalidade nos animais do Grupo 1, em 52 horas, 100% nos animais do Grupo 2, em 126 horas e 50% nos animais do Grupo 3, em 50 horas. Os animais do Grupo 4 sobreviveram além de 11 dias. O teste de Log-Rank mostrou que houve aumento significativo na curva de sobrevida do Grupo 4 com relação ao Grupo 3 ($p < 0,01$), do Grupo 4 com relação aos grupos 2 e 1 ($p < 0,001$), do Grupo 3 com relação ao Grupo 1 ($p < 0,001$) e não houve diferença entre os grupos 1 e 2 (Figura 1).

Quadro I – Bactérias Isoladas da Secreção Peritoneal de Ratos Submetidos à Peritonite Fecal e Sensibilidade - Antibiograma

Bactéria isolada	Sensibilidade
- <i>Aerococcus viridans</i> - <i>Bacillus species</i> - <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Staphylococcus sciuri</i> - <i>Staphylococcus epidermidis</i>	gatifloxacina, linezolida, sinercid, tetraciclina, trimetoprin/sulfa, vancomicina
- <i>Enterococcus gallinarum</i>	amoxicilina/clav, ampicilina/sulbactam, ampicilina, cefazolina, ceftriaxone, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, nitrofurantoína, norfloxacina, oxacilina, penicilina, rifampicina
- <i>Escherichia coli</i> - <i>Proteus penneri</i> - <i>Proteus mirabilis</i> - <i>Morganella morganii</i>	amicacina, ampicilina/sulbactam, ampicilina, aztreonam, cefazolina, cefepime, cefotetan, ceftazidime, ceftriaxone, cefuroxime, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, meropenem,
- <i>Klebsiella pneumoniae</i>	amicacina, ampicilina/sulbactam, ampicilina, aztreonam, cefazolina, cefepime, cefotetan, ceftriaxone, cefuroxime, ciprofloxacina, gentamicina, imipenem, levofloxacina, meropenem
- <i>Micrococcus</i>	amoxicilina/clav, ampicilina/sulbactam, ampicilina, cefazolina, ceftriaxone, ciprofloxacina, clindamicina, eritromicina, gentamicina, levofloxacina, nitrofurantoína, norfloxacina, oxacilina, penicilina, rifampicina

Tabela III – Ratos que Sobreviveram até o 11º Dia de Pós-Operatório * após Indução de Peritonite e Submetidos à Laparotomia

Grupo	Óbito		Significância estatística (p)		
	Não	Sim	p1	p2	p3
1	0	12			
2	0	12	ns		
3	6	6	0,01	0,01	
4	12	0	0,0000	0,0000	0,01
Total	18	30			

Teste exato de Fisher.

Grupo 1 – controle: nenhum tratamento; Grupo 2 – enxugamento da cavidade abdominal; Grupo 3 – lavagem da cavidade abdominal com 3 mL de solução fisiológica a 0,9% e enxugamento; Grupo 4 – lavagem da cavidade abdominal com 8 mg.kg⁻¹ (± 0,5 mL) de bupivacaína 0,5% e 2,5 mL de solução fisiológica a 0,9% e enxugamento.

p1 – com relação ao Grupo 1; p2 – com relação ao Grupo 2; p3 – com relação ao Grupo 3.

ns = não-significativo; p1, p2, p3 < 0,05 - significativo.

* Os ratos que sobreviveram até o 11º dia de pós-operatório estavam clinicamente estáveis e foram mortos para estudo.

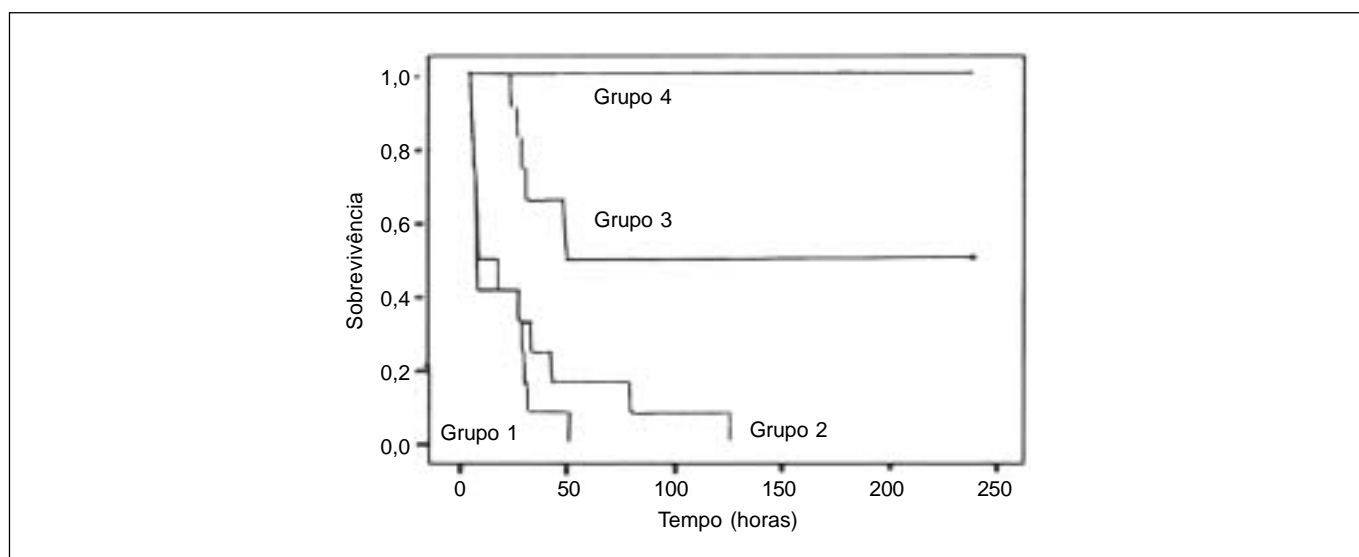


Figura 1 – Curva de Sobrevivência dos Ratos Submetidos à Laparotomia seguida de: Grupo 1 - controle: nenhum tratamento; Grupo 2: enxugamento da cavidade abdominal; Grupo 3: lavagem da cavidade abdominal com 3 mL de solução fisiológica a 0,9% e enxugamento; Grupo 4: lavagem da cavidade abdominal com 8 mg.kg⁻¹ (± 0,5 mL) de bupivacaína 0,5% e 2,5 mL de solução fisiológica a 0,9% e enxugamento.

Log Rank p < 0,05 - do Grupo 4 com relação ao Grupo 3, do Grupo 4 com relação aos grupos 2 e 1, do Grupo 3 com relação ao Grupo 1. Não houve diferença entre os grupos 1 e 2.

DISCUSSÃO

Neste estudo a lavagem da cavidade abdominal com solução de bupivacaína evitou a morte dos animais submetidos à peritonite por fezes autólogas. Resultado semelhante foi observado quando se lavou a cavidade abdominal de ratos com antibiótico para tratar a peritonite por dose letal de *Escherichia coli*²². Esse fato não ocorreu quando a cavidade abdominal com peritonite não foi tratada (grupo-controle) ou mesmo quando foi enxugada (Grupo 2) ou enxugada e lavada com solução fisiológica (Grupo 3). No Grupo 3, em que

se realizou o enxugamento da cavidade seguida da lavagem peritoneal com solução fisiológica, houve maior sobrevivência que no grupo-controle. Isso mostra que a lavagem foi benéfica nesse modelo de peritonite. Apesar de ser motivo de controvérsias, a lavagem peritoneal na peritonite é utilizada por grande número de cirurgiões^{23,24}. A lavagem peritoneal com solução fisiológica, em ratos com peritonite, resultou em menor mortalidade comparada com a simples limpeza da cavidade com compressas. No Grupo 4 a adição da bupivacaína à solução fisiológica foi mais eficaz para combater a peritonite. O mecanismo pelo qual os anestésicos

cos locais combatem a peritonite é basicamente antiinflamatório. A infusão contínua por bomba, por via subcutânea, de lidocaína a 5% e 10% e a bupivacaína a 1% e 2%, reduziu a mortalidade em ratos com peritonite¹⁸. Os anestésicos locais se mostraram eficazes para modular a cascata inflamatória na isquemia e reperfusão do coração^{8,9}, do pulmão¹⁰ e fígado¹² e foram capazes de exercer efeito antiinflamatório em vários tipos de células, incluindo monócitos, macrófagos e neutrófilos¹⁴. A ropivacaína atenuou a resposta inflamatória pulmonar por lipopolissacarídeo em ratos¹⁵. A lidocaína a 1% e a bupivacaína a 0,5% também foram capazes de prevenir a peritonite provocada por ácido clorídrico a 0,1 M¹⁶. A ativação da cascata da coagulação tem sido associada ao desenvolvimento da falência de múltiplos órgãos e sistemas, com prognóstico ruim em pacientes sépticos. Isso provavelmente decorre da coagulação intravascular disseminada que compromete o fluxo sanguíneo vital para o órgão, resultando em falência orgânica e morte²⁵. Neste estudo esse fato não ficou demonstrado nos animais tratados com solução de anestésico local porque todos sobreviveram.

Além do efeito antiinflamatório, alguns anestésicos locais apresentam efeito bactericida contra algumas bactérias em laboratório^{19,20}. Nesse experimento, não foi realizado o teste de sensibilidade das bactérias isoladas da cavidade abdominal dos ratos, porque em estudo piloto não foi possível concluir a respeito do efeito bacteriostático ou bactericida desses fármacos. Assim, além do possível efeito antiinflamatório dos anestésicos locais, deve-se considerar que o enxugamento da cavidade abdominal no Grupo 4 é também um mecanismo de combate à peritonite, porque remove bactérias e toxinas.

Nos animais sobreviventes, as cavidades abdominais apresentavam aderências mais intensas que nos animais que faleceram. As aderências têm a função de isolar os processos sépticos e proteger o organismo da bacteremia. A inibição dessas aderências é acompanhada de maior mortalidade, decorrente do processo séptico intra-abdominal generalizado²⁶.

Os animais dos grupos-controle, 2 e 3, que faleceram, apresentavam no pós-operatório imediato manifestações de sepse, tais como: taquipnéia, anorexia, adinamia, piloereção e halo escuro em torno dos olhos, conforme relatado por Guilgen²⁷. Os animais que sobreviveram estavam ativos e procuravam se alimentar. Em estudo piloto os autores observaram que os ratos que sobreviveram até o 10º dia não faleceram por peritonite. Por isso, o período de 10 dias foi utilizado para o estudo macroscópico da cavidade abdominal (*post-mortem*) e como parâmetro para a análise estatística da sobrevida dos animais. Considerando que não houve diferença estatística significativa entre os pesos dos animais nos quatro grupos, que os animais eram da mesma linhagem e que a técnica de peritonite foi a mesma, pode-se de certa forma estabelecer comparações na sobrevida entre os diferentes grupos.

A dose de anestésico local utilizada foi mínima, se for considerado que a dose letal média (LD₅₀) de bupivacaína intraperitoneal é de 57,7 a 58,7 mg.kg⁻¹²⁸. Na lavagem peritoneal, realizada após um primeiro enxugamento da cavidade abdominal, procurou-se espalhar o anestésico manualmente, para que esse fármaco tivesse o maior contato possível com todas as vísceras abdominais. A solução anestésica foi mantida por cerca de três minutos na cavidade para haver tempo suficiente da atuação. O segundo enxugamento foi realizado com movimentos suaves, evitando a retirada de todo o conteúdo da solução. Esse método foi satisfatório, uma vez que não houve óbito no Grupo 4, no qual foi utilizado o anestésico. Outros estudos poderão ser desenvolvidos para estudar outros anestésicos locais, em outros modelos de peritonite, associados ou não a outros recursos terapêuticos. Também poderão ser realizados novos estudos para verificar o efeito de cada anestésico local nas bactérias causadoras de peritonite, na função dos órgãos e na reação inflamatória produzida antes e após a aplicação desses fármacos. Na vigência de peritonite, os cirurgiões mostram-se preocupados com o grau de acometimento da célula mesotelial (peritônio) e o real valor da lavagem peritoneal. A lavagem peritoneal com solução de bupivacaína diluída em solução fisiológica a 0,9% foi eficaz para evitar o óbito em animais com peritonite fecal autóloga induzida.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Apoio à Pesquisa Clínica e Experimental do Instituto de Desenvolvimento Sustentável (Instituto Solidário do Espírito Santo) pelo auxílio financeiro.

Effects of Peritoneal Lavage with Bupivacaine on Survival of Mice with Fecal Peritonitis

Marcos Célio Brocco, TSA, M.D.; Danilo Nagib Salomão Paulo, M.D.; João Florêncio de Abreu Baptista, M.D.; Antônio Roberto Carraretto, TSA, M.D.; Thiago Antunes Ferrari, M.D.; Thiago Caetano V. de Azevedo, M.D.; Alcino Lázaro da Silva, M.D.

INTRODUCTION

Despite advances in the treatment of peritonitis, its mortality rate has not decreased in the last two decades¹. The mortality rate increases when multiple organ and system failure are present. This dysfunction, although its pathogeny has not been elucidated, seems to be secondary to a complex inflammatory complex. The septic response is associated with the release of anti-inflammatory and proinflammatory cytokines¹²⁻⁴ with subsequent activation of leukocytes, and

complement and coagulation cascades ⁵, besides the production of antibodies and bacterial destruction by polymorphonuclear cells ⁶. Mediators, such as TNF-alpha, interleukins (IL-1 beta, IL-6, and IL-8), and nitric oxide (NO) have a fundamental role in sepsis, and inflammatory mediators are present concomitantly, modulating the effects and release of inflammatory mediators ⁷.

Local anesthetics have shown to be effective in modulating the inflammatory cascade during ischemia and reperfusion of the heart ^{8,9}, lungs ^{10,11}, and liver ^{2,13}. They have an anti-inflammatory action in several types of cells, including monocytes, macrophages, and neutrophils. Ropivacaine reduced the pulmonary inflammatory response caused by lipopolysaccharides in mice ¹⁵. Lidocaine, at 1%, and 0.5% bupivacaine demonstrated to be effective on preventing peritonitis induced by 0.1 M of hydrochloric acid when compared with NS ¹⁶. The mortality of mice with septic peritonitis induced according to an experimental model ¹⁷ treated with the subcutaneous administration of 5% and 10% lidocaine and 1% and 2% bupivacaine with an infusion pump was reduced and protected against hepatic and renal dysfunctions, by attenuating the hyper-inflammatory response ¹⁸. Besides, some anesthetics have a bactericidal action against some bacteria *in vitro* ¹⁹⁻²⁰. Based on those studies, it was questioned whether the application of intra-peritoneal local anesthetic could interfere with survival of animal with peritonitis. Thus, the objective of the present study was to determine the effects of the infusion of bupivacaine on the abdominal cavity of mice with induced fecal peritonitis.

METHODS

This study was approved by the Ethics on Research Committee of the Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), according to protocol number 144/06 (COEP-CETEA).

Forty-eight Wistar mice, weighing 300 g to 330 g (311.45 ± 9.67), provided by the Biotherium of the Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória, ES (EMESCAM) were used.

Animals were anesthetized with 12.5 mg.kg^{-1} of S(+)-ketamine hydrochloride, the left inferior quadrant of the abdomen was punctured with a 16G catheter, and the animals were weighed on an electronic scale with a 1 g sensitivity. Peritonitis was induced by the intrabdominal injection of 5 mL.kg^{-1} of a suspension of 2 g of feces recently defecated diluted in 17 mL of NS and filtered through a 4 × 4 bandage to allow its free flow through the needle. Six hours after induction of peritonitis, mice were anesthetized with a mixture of 2.5 mg.kg^{-1} of xylazine chloride with 25 mg.kg^{-1} of S(+)-ketamine hydrochloride, and underwent median laparotomy approximately 2 cm long, assessment of the cavity, collection of 0.5 mL of secretion for bacterioscopy, and culture and sensitivity. At this moment, animals were randomly distributed in four groups (Table I).

Table I – Procedures Performed in the Different Groups

Group	Procedure
1 (n = 12)	No treatment
2 (n = 12)	Drying out of the abdominal cavity
3 (n = 12)	Lavage with 3 mL of NS and drying out of the abdominal cavity
4 (n = 12)	Lavage with 8 mg.kg^{-1} ($\pm 0.5 \text{ mL}$) of 0.5% bupivacaine without adrenalin, and 2,5 mL of NS and drying out of the abdominal cavity

Group 3 received 3 mL of NS; and Group 4, 8 mg.kg^{-1} of 0.5% bupivacaine ($\pm 0.5 \text{ mL}$) mixed with 2.5 mL of NS, for a total volume of 3 mL.

In groups 3 and 4, NS, with or without anesthetic, remained in the abdominal cavity for three minutes. During this period, the solution was manually distributed among the abdominal organs, to allow greater contact with the peritoneum. Afterwards, the peritoneal fluid was dried out with gauze pads to remove as much as possible of the solution. The abdominal wall was sutured in two planes using continuous running suture with 4.0 nylon monofilament. The muscular-aponeurotic plane was sutured followed by the skin. In the postoperative period, all animals were hydrated with a single subcutaneous dose of 10 mL of NS every 24 hours for two days. Subcutaneous nalbufine chlorhydrate, 0.1 mg.kg^{-1} every 8 hours for two days, was used for analgesia.

Animals that died underwent necropsies and the time of death was recorded. Surviving animals were killed on the 11th postoperative day with the administration of 50 mg.kg^{-1} of sodium pentobarbital in the abdominal cavity. At this time, the abdominal cavity, possible adhesions, and foci of infection were examined, and material was collected for bacteriological studies. Adhesions were classified in six degrees ²¹ (Table II).

Table II – Classification of Adhesions

Degree 0	Absence.
Degree 1	Reduced number, fibrinous in nature, easily undone by manipulation.
Degree 2	Firm, resistant to manipulation, between abdominal loops, but without abdominal wall involvement.
Degree 3	Firm, resistant to manipulation, between the abdominal wall and one organ or structure.
Degree 4	Firm, resistant to manipulation, between the abdominal wall and more than one organ or structure.
Degree 5	Firm, resistant to manipulation, between intestinal loops and among intestinal loops and the abdominal wall with enteric fistula.

Modified from Diogo-Filho A, Lazarini BCM, Vieira-Junior F et al. ²¹.

Mean survival, number of survivors in each group, and survival curve were analyzed. For such, non-parametric studies were used to compare length of survival (Student *t* test for independent samples), number of survivors (Fisher's exact test), and the survival by the Kaplan Meier curve with the Log Rank test. A *p* < 0.05 was considered significant.

RESULTS

Laparotomy performed 6 hours after abdominal puncture and injection of fresh feces showed edema, hyperemia among the intestinal loops, and the presence of purulent secretion in the abdominal cavity.

Bacteria isolated from the peritoneal fluid at the time of laparotomy included: *Proteus mirabilis*, *Klebsiela pneumoni-*

ae, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Micrococcus*, *Proteus penneri*, *Enterococcus gallinarum*, *Staphylococcus sciuri*, *Bacillus species*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Aerococcus viridans*. Chart I shows the sensitivity of those bacteria to antibiotics.

Mice that survive the postoperative period were dynamic, ingested liquid meals, and the exam of the abdominal cavity showed 2nd and 3rd degree adhesions. Mice that died presented apathy, erected hairs, dark circles around their eyes, tachycardia, and anorexia. Exam of the abdominal cavity revealed a small amount of purulent secretion and loose adhesions between the intestinal loops, classified as 0 and 1st degree adhesions (Table I).

Animal survival was more frequent in Group 4 than in Group 3 (*p* < 0.01) and than in Groups 2 and 1 (*p* < 0.001) (Table III).

Table III – Mice that Survived Until the 11th Postoperative Day* after Induction of Peritonitis and Undergoing Laparotomy

Group	Death		Statistical significance (p)		
	No	Yes	p1	p2	p3
1	0	12			
2	0	12	ns		
3	6	6	0.01	0.01	
4	12	0	0.0000	0.0000	0.01
Total	18	30			

Fisher Exact Test.

Group 1 – control: no treatment; Group 2 – drying out of the abdominal cavity; Group 3 – lavage with 3 mL of NS and drying out of the abdominal cavity; Group 4 - lavage with 8 mg.kg⁻¹ (± 0.5 mL) of 0.5% bupivacaine and 2.5 mL of NS and drying out of the abdominal cavity. p1- in relation to Group 1; p2 – in relation to Group 2; p3 – in relation to Group 3.

ns = non significant; p1, p2, p3 < 0.05 - significant.

*Mice that survived until the 11th postoperative day were clinically stable and were killed for the study.

Chart I – Bacteria Isolated from the Peritoneal Secretion of Mice with Fecal Peritonitis and their Sensitivity

Bacteria isolated	Sensitivity
- <i>Aerococcus viridans</i> - <i>Bacillus species</i> - <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Staphylococcus sciuri</i> - <i>Staphylococcus epidermidis</i>	gatifloxacin, linezolid, synergid, tetracycline, trimethoprim/sulfa, vancomycin
- <i>Enterococcus gallinarum</i>	amoxicillin clavulanate, ampicillin/sulbactam, ampicillin, cefazolin, ceftriaxone, ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, gentamycin, nitrofurantoin, norfloxacin, oxacillin, penicillin, rifampicin
- <i>Escherichia coli</i> - <i>Proteus penneri</i> - <i>Proteus mirabilis</i> - <i>Morganella morganii</i>	amikacin, ampicillin /sulbactam, ampicillin, aztreonam, cefazolin, cefepime, cefotetan, ceftazidime, ceftriaxone, cefuroxime, ciprofloxacin, gentamycin, imipenem, levofloxacin, meropenem,
- <i>Klebsiela pneumoniae</i>	amikacin, ampicillin /sulbactam, ampicillin, aztreonam, cefazolin, cefepime, cefotetan, ceftriaxone, cefuroxime, ciprofloxacin, gentamycin, imipenem, levofloxacin, meropenem
- <i>Micrococcus</i>	amoxicillin clavulanate, ampicillin/sulbactam, ampicillin, cefazolin, ceftriaxone, ciprofloxacin, clindamycin, erythromycin, gentamycin, levofloxacin, nitrofurantoin, norfloxacin, oxacillin, penicillin, rifampicin

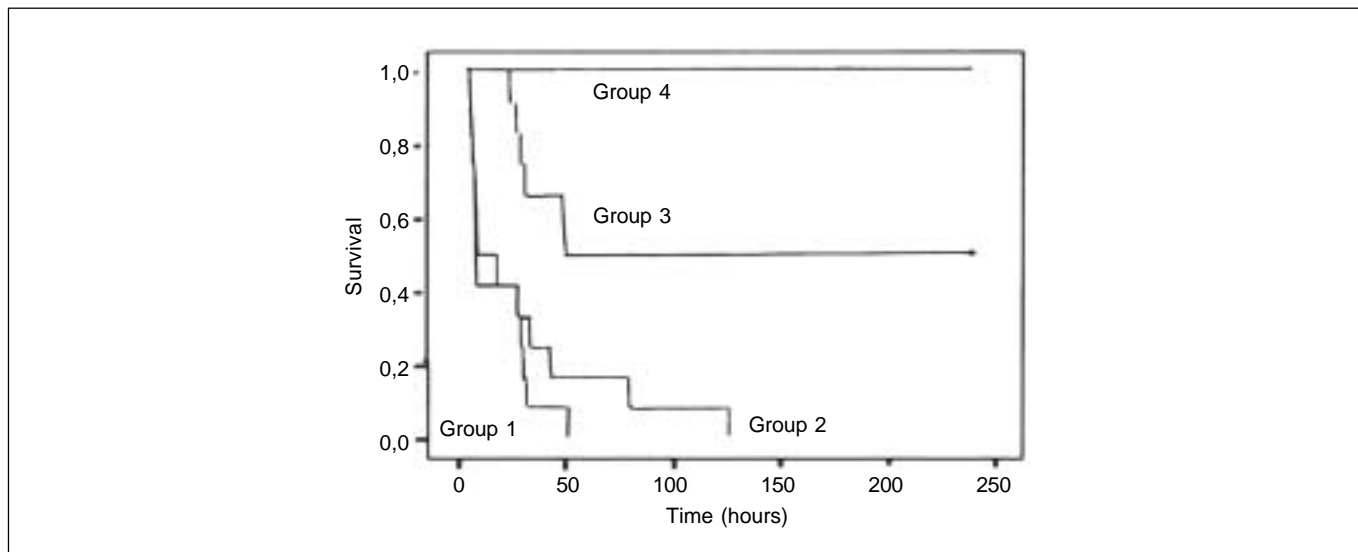


Figure 1 – Survival Curve of Mice Undergoing Laparotomy followed by: Group 1 – control: No treatment; Group 2: Drying out of the abdominal cavity; Group 3: Lavage with 3 mL of NS and drying out of the peritoneal cavity; Group 4: Lavage with 8 mg.kg⁻¹ (\pm 0.5 mL) of 0.5% bupivacaine and 2.5 mL of NS and drying out of the peritoneal cavity.

Log Rank $p < 0.05$ – of Group 4 in relation to Group 3, Group 4 in relation to Groups 2 and 1, and Group 3 in relation to Group 1. There were no differences between Groups 1 and 2.

The survival curve demonstrated 100% mortality in Group 1 in 52 hours, 100% mortality in Group 2 in 126 hours, and 50% mortality in Group 3 in 50 hours. (The log-Rank test demonstrated a significant increase in the survival curve in Group 4 when compared with Group 3 ($p < 0.01$) and when compared with groups 2 and 1 ($p < 0.001$), and between Groups 3 and 1 ($p < 0.001$); there were no statistically significant differences between Groups 1 and 2 (Figure 1).

DISCUSSION

In the present study, lavage of the peritoneal cavity with bupivacaine solution avoided the death of animals subjected to autologous fecal peritonitis. A similar result was observed when the peritoneal cavity was bathed in antibiotics to treat *Escherichia coli* peritonitis²². This did not happen when the peritoneal cavity with peritonitis was not treated (control Group), or even when it was dried out (Group 2) and dried out and flushed with NS (Group 3). Group 3 had a greater survival rate than the control group. This shows that lavage was beneficial in this model of peritonitis. Although it is the subject of controversy, peritoneal lavage in peritonitis is used by a large number of surgeons^{23,24}. Peritoneal lavage with NS in mice with peritonitis resulted in decreased mortality when compared with just cleaning the abdominal cavity with gauze pads. In group 4, the addition of bupivacaine to NS was effective in the treatment of peritonitis. Basically, local anesthetics behave as anti-inflammatories. Continuous subcutaneous infusion of 5% and 10% lidocaine and 1% and 2% bupivacaine with a pump reduced the mortality of mice with

peritonitis¹⁸. It has been shown that local anesthetics are effective modulators of the inflammatory cascade in ischemia and reperfusion of the heart^{8,9}, lungs¹⁰, and liver¹², and they have an anti-inflammatory action in different types of cells, including monocytes, macrophages, and neutrophils¹⁴. Ropivacaine attenuated the pulmonary inflammatory response to lipopolysaccharides in mice¹⁵. Lidocaine at 1% and 0.5% bupivacaine were also capable to prevent peritonitis caused by 0.1 M of hydrochloric acid¹⁶. Activation of the coagulation cascade has been associated with the development of multiple organ failure, with a poor prognosis in septic patients. This is probably due to disseminated intravascular coagulation that compromises the blood flow vital for organ survival, resulting in organ failure and death²⁵. In the present study, this was not demonstrated in animals treated with local anesthetic solution because they all survived.

Besides the anti-inflammatory action, some local anesthetics are bactericidal against some bacteria *in vitro*^{19,20}. In this study, the sensitivity of the bacteria isolated from the abdominal cavity was not done because in a pilot study it was not possible to reach a conclusion regarding the bacteriostatic and bactericidal actions of those drugs. Therefore, besides the probable anti-inflammatory actions of local anesthetics, one should consider that drying out of the abdominal cavity of animals in Group 4 is also a treatment for peritonitis because it removes bacteria and toxins.

In surviving animals, their abdominal cavities showed the presence of more severe adhesions than in animals that died. Adhesions work by isolating septic processes and protect the organism against bacteremia. The inhibition of

adhesion formation is accompanied by increased mortality secondary to the generalized intra-abdominal septic process²⁶. Animals in the control group and groups 2 and 3 that died presented, in the immediate postoperative period, manifestations of sepsis, such as: tachypnea, anorexia, apathy, erection of their fur, and dark circles around their eyes, similar to the report of Guilgen²⁷. Animals that survived were active and fed themselves. In a pilot study, the authors observed that mice that survived until the 10th day did not die as a consequence of peritonitis. For this reason, we used the 10-day period for the macroscopic study of the abdominal cavity (*post-mortem*) and as a parameter to for the statistical analysis of animal survival. Considering that there were no statistically significant differences among the weights of the animals in all four groups, animals were all from the same lineage, and the same peritonitis technique was used, one can compare the survival among the different groups.

The dose of local anesthetic used was minimal if one considers that the mean lethal dose (LD₅₀) of intraperitoneal bupivacaine is 57.7 to 58.7 mg.kg⁻¹²⁸. In the peritoneal lavage performed after first drying out the abdominal cavity, the local anesthetic was spread manually to guarantee the greatest contact possible of the drug with the abdominal organs. The anesthetic solution remained for three minutes in the abdominal cavity to allow enough time for its action. The second drying out of the abdominal cavity was done with smooth movements, avoiding the complete removal of the solution. This method was satisfactory since there were no deaths in Group 4. Other studies can be done to evaluate other local anesthetics in other models of peritonitis, associated with other therapeutic resources or not. New studies will also be able to be conducted to determine the effects of each local anesthetic on bacteria that cause peritonitis, on organ function, and on the inflammatory reaction produced before and after the use of those drugs. In face of peritonitis, surgeons have shown concerns with the degree of compromise of mesothelial cells (peritoneum) and the real value of peritoneal lavage.

Peritoneal lavage with bupivacaine diluted in NS was effective in avoiding death in animals with induced autologous peritonitis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to acknowledge the Clinical and Experimental Research Supporting Department of the Instituto de Desenvolvimento Sustentável (Instituto Solidário do Espírito Santo) for its financial support.

REFERÊNCIAS – REFERENCES

01. Sands KE, Bates DW, Handen PN et al. — Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. *JAMA*, 1997;278:23-40.

02. Garrido AG, Figueiredo LFP, Rocha e Silva M — Modelos experimentais de sepse e choque séptico: revisão. *Acta Cir Bras*, 2004;19:1-14.

03. Araújo Filho I, Honorato Sobrinho AA, Rego AC et al. — Influence of laparoscopy and laparotomy on gasometry, leukocytes and cytokines in a rat abdominal sepsis model. *Acta Cir Bras*, 2006; 21:74-79.

04. Van der Poll T, van Deventer SHJ — Cytokines and anticytokines in the pathogenesis of sepsis. *Infect Dis Clin North Am*, 1999; 13:413-428.

05. Dellinger RP — Inflammation and coagulation: implication for the septic patient. *Clin Infect Dis*, 2003;36:1259-1265.

06. Chalkiadis G, Kostakis A, Karayannacos PE et al. — The effect of heparin upon fibrinopurulent peritonitis in rats. *Surg Gynecol Obstet*, 1983;157:257-260.

07. Benjamin CF — Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. *Medicina (Ribeirão Preto)*, 2001;34:18-26.

08. Strohm C, Barancik T, Bruhl ML et al. — Inhibition of the ER-kinase cascade by PD98059 and UO 126 counteracts ischemic preconditioning in pig myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000;36: 218-229.

09. Lee R, Nitta T, Schmid RA et al. — Retrograde infusion of lidocaine or L-arginine before reperfusion reduces myocardial infarct size. *Ann Thorac Surg*, 1998;65:1353-1359.

10. Das KC, Misra HP — Prevention of reperfusion lung injury by lidocaine in isolated rat lung ventilated with higher oxygen levels. *J Postgrad Med*, 2003;49:17-20.

11. Schmid RA, Yamashita M, Ando K et al. — Lidocaine reduces reperfusion injury and neutrophil migration in canine lung allografts. *Ann Thorac Surg*, 1996;61:949-955.

12. Tomori H, Shiraishi M, Koga H et al. — Protective effects of lidocaine in hepatic ischemia/reperfusion injury in vitro. *Transplant Proc*, 1998;30:3740-3742.

13. Chen MY, Li CH, Huang ZQ et al. — Protective effects of lidocaine injected into the hepatoduodenal ligament on warm ischemia - reperfusion injury to the rat liver. *Chin Med J*, 2004;117:275-279.

14. Hollmann MW, Durieux ME — Local anesthetics and the inflammatory response: A new therapeutic indication. *Anesthesiology*, 2000;93:858-875.

15. Blumenthal S, Borgeat A, Pasch T et al. — Ropivacaine decreases inflammation in experimental endotoxin-induced lung injury. *Anesthesiology*, 2006;104:961-969.

16. Rimbäck G, Cassuto J, Wallin G et al. — Inhibition of peritonitis by amide local anesthetics. *Anesthesiology*, 1988;69:881-886.

17. Walley KR, Lukacs NW, Standiford TJ et al. — Balance of inflammatory cytokines related to severity and mortality of murine sepsis. *Infect Immun*, 1996;64:4733-4738.

18. Gallos G, Jones DR, Nasr SH et al. — Local anesthetics reduce mortality and protect against renal and hepatic dysfunction in murine septic peritonitis. *Anesthesiology*, 2004;101:902-911.

19. Aydin ON, Eyigor M, Aydin N — Antimicrobial activity of ropivacaine and other local anaesthetics. *Eur J Anaesth*, 2001;18: 687-694.

20. Par AM, Zoutman DE, Davidson JS — Antimicrobial activity of lidocaine against bacteria associated with wound infection. *Ann Plast Surg*, 1999;43:239-245.

21. Diogo-Filho A, Lazarini BCM, Vieira-Junior F et al. — Avaliação das aderências pós-operatórias em ratos submetidos a peritoniotomias com tela de polipropileno associada à nitrofurazona. *Arq Gastroenterol*, 2004;41:245-249.

22. Sortini D, Feo CV, Maravegias K et al. — A role of peritoneal lavage in adhesion formation and survival rate in rats: an experimental study. *J Invest Surg*, 2006;19:291-297.

23. Whiteside OJ, Tytherleigh MG, Thrush S et al. — Intra-operative peritoneal lavage - who does it and why? *Ann R Coll Surg Engl*, 2005;87:225-228.

24. 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.
25. Levi M, Tem Cate H — Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med*, 1999;341:586-592.
26. Rodrigues FHOC, Carneiro BGMC, Rocha RF et al. — Inibição da formação de abscesso abdominal em rato - Mortalidade por sepse. *Arq Gastroenterol*, 2005;42:50-54.
27. Guilgen GA, Czesko NG, Malafaia O et al. — Peritonite infecciosa com quantitativos e qualitativos bacterianos conhecidos – estudo experimental em ratos. *Rev Col Bras Cir*, 1998;25:39-43.
28. De Jong RH, Bonin JD — Deaths from local anesthetic-induced convulsion in mice. *Anesth Analg*, 1980;59:401-405.

RESUMEN

Brocco MC, Paulo DNS, Baptista JFA, Carraretto AR, Ferrari TA, Azevedo TCV, Silva AL — Efecto del Lavado Peritoneal con Bupivacaína en la Sobrevida de Ratonos con Peritonitis Fecal.

JUSTIFICATIVA Y OBJETIVOS: Basados en los conocimientos sobre la acción antiinflamatoria y antibacteriana de los anestésicos locales (AL), el estudio tuvo el objetivo de verificar el efecto del lavado peritoneal con solución de bupivacaína en la sobrevida de ratones con peritonitis fecal por heces autógenas.

MÉTODOS: Se usaron 48 ratones de la raza Wistar, con peso entre 300 g y 330 g ($311,45 \pm 9,67$), sometidos a la laparotomía 6 horas después de la inducción de peritonitis, distribuidos aleatoriamente en 4 grupos: 1 – Control, ningún tratamiento ($n = 12$); 2 – Secado de la cavidad abdominal ($n = 12$); 3 – Lavado de la cavidad abdominal con 3 mL de solución fisiológica a 0,9% y secado ($n = 12$); 4 – Lavado de la cavidad abdominal con 8 mg.kg⁻¹ ($\pm 0,5$ mL) de bupivacaína 0,5%, adicionada a 2,5 mL de solución fisiológica a 0,9% y secado ($n = 12$). Los animales que murieron fueron llevados a necropsia y el horario del óbito se anotó. Los animales sobrevivientes se sacrificaron al 11º día del postoperatorio y se realizó la necropsia.

RESULTADOS: Hubo un 100% de mortalidad en los animales del Grupo 1 en 52 horas, 100% en los animales del Grupo 2, en 126 horas y un 50% en los animales del Grupo 3 en 50 horas. Los animales del Grupo 4 sobrevivieron. La sobrevida, al 11º día del postoperatorio, fue mayor en los grupos 3 y 4 con relación a los grupos 1 y 2 ($p < 0,001$) y mayor en los Grupo 4 con relación al Grupo 3 ($p < 0,01$).

CONCLUSIONES: El lavado peritoneal con solución de bupivacaína diluida en solución fisiológica fue eficaz para evitar el óbito, por 11 días, en un 100% de los animales con peritonitis fecal.