

GUILHERME VERAS MASCENA



**RESPOSTA TERAPÊUTICA DE RATOS DE IDADES
CRESCENTES COM PERITONITE FECAL AUTÓGENA
GRAVE TRATADOS COM MEROPENEM INTRAVENOSO**

Recife
2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

Guilherme Veras Mascena

**RESPOSTA TERAPÊUTICA DE RATOS DE IDADES
CRESCENTES COM PERITONITE FECAL AUTÓGENA
GRAVE TRATADOS COM MEROPENEM INTRAVENOSO**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Orientador Interno

Dr. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Titular do Depto. de Cirurgia, CCS-UFPE

Linha de Pesquisa

Biologia e imunologia das infecções em cirurgia

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Mônica Uchôa. CRBA-1010

O69c Mascena, Guilherme Veras

Resposta terapêutica de ratos com peritonite fecal submetidos ao uso de meropenem / Guilherme Veras Mascena. – 2014.

63 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Carlos Teixeira Brandt

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Recife, 2014.

Inclui referências e anexos.

1. Peritonite. 2. Carbapenêmicos. 3. Tratamento. 4. Ratos. I. Brandt, Carlos Teixeira (Orientador). II. Título.

612.665

CDD (23.ed)

UFPE (CCS2014-089)

“RESPOSTA TERAPÊUTICA DE RATOS DE IDADES CRESCENTES COM PERITONITE FECAL AUTÓGENA GRAVE TRATADOS COM MEROPENEM INTRAVENOSO”.

GUILHERME VERAS MASCENA

APROVADA EM: 10/11/2014

ORIENTADOR INTERNO: **Dr. CARLOS TEIXEIRA BRANDT**

COMISSÃO EXAMINADORA:

PROF. Dr. - JOSEMBERG MARINS CAMPOS (PRESIDENTE) -CCS/UFPE

PROF. Dr. JOSÉ GUIDO CORRÊA DE ARAUJO JÚNIOR - CCS/UFPE

PROF. Dr. – RODRIGO PESSOA CAVALCANTI LIRA -CCS/UFPE

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA



REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DIRETOR

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

HOSPITAL DAS CLÍNICAS

DIRETOR SUPERINTENDENTE

Prof. Frederico Jorge Ribeiro

DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

CHEFE

Prof. Saulo Monteiro dos Santos

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

NÍVEL MESTRADO E DOUTORADO

COORDENADOR

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

VICE-COORDENADOR

Prof. Josemberg Marins Campos

CORPO DOCENTE

Prof. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Prof. Carlos Teixeira Brandt

Prof. Fernando Ribeiro de Moraes Neto

Prof. José Lamartine de Andrade Aguiar

Prof. Josemberg Marins Campos

Prof. Lucio Vilar Rabelo Filho

Profa. Magdala de Araújo Novaes

Prof. Rodrigo Pessoa Cavalcanti Lira

Prof. Salvador Vilar Correia Lima

Prof. Sílvio Caldas Neto

Dedico

*À minha esposa, **Rossana**, que diante dos momentos de desânimo e cansaço, soube ter paciência e carinho. A construção de nossa família é, sem dúvida, a maior obra de nossas vidas.*

*Às minhas filhas, **Luísa** e **Júlia**, que me apresentaram o amor incondicional e me tornaram um homem melhor.*

*À minha mãe, **Márcia**, pelo eterno incentivo aos meus estudos. Sempre pronta a me ajudar, nunca mediu esforços para que pudesse realizar meus sonhos.*

*Aos meus irmãos, **Gustavo** (in memoriam) e **Giuseppe**, que sempre acreditaram e valorizaram cada conquista de minha vida.*

*Ao meu avô, **Ivo Mascena** (in memoriam), pelas inúmeras e profundas lições de vida. Sua existência marcou de maneira indelével minha formação moral e humanística.*

AGRADECIMENTOS

*Ao professor, amigo e mentor **Carlos Teixeira Brandt**, um verdadeiro missionário da Ciência que leva seu entusiasmo e dedicação para além das fronteiras pernambucanas. Obrigado mestre, por me ensinar a distinguir a verdade do que parece verdade.*

*A **Gisele** e **Dalton Gadelha**, pelo apoio irrestrito à concretização deste mestrado. Ao vislumbrarem o impossível, permitiram que muitos de nós concretizássemos nossos sonhos.*

*Ao farmacêutico, amigo e cunhado, **Henrique Fischer**, pelo preparo e manipulação das medicações utilizadas neste estudo.*

*A amiga e mestrandia **Thárcia Kiara Beserra Oliveira**, pelo inestimável apoio na execução deste projeto.*

*Aos amigos **Jéssica Pereira de Simões Ataíde** e **Gustavo Brasil Marcelino**, pela ajuda nas coletas realizadas ao longo deste projeto.*

RESUMO

Objetivo: Avaliar o resultado do tratamento com meropenem intravenoso de peritonite grave em ratos com diferentes idades.

Métodos: Trinta ratos Wistar estratificados em três grupos: grupo I - seis meses de idade; grupo II - 12 meses de idade; e grupo III - 18 meses de idade, submetidos à indução de peritonite autógena com suspensão de fezes a 10% (6ml/kg de rato), foram tratados com meropenem intravenoso na dose única de 40mg/Kg de rato. Os animais que sobreviveram foram acompanhados por 45 dias. Os parâmetros das variáveis quantitativas foram expressos por suas médias e pelo erro padrão da média (EPM) e $p < 0,05$ foi usado para rejeitar a hipótese de nulidade. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais. **Resultados:** A mortalidade foi igual para os grupos I e II (10%). No grupo III, 4 dos 10 animais morreram nas primeiras 24 horas e mais 4 até 48 horas. De interesse, mesmo os ratos jovens que sobreviveram apresentaram abscessos residuais nas cavidades abdominal e torácica, embora tenham evoluído com vida quase normal. Com exceção de um rato do grupo I, todos os animais sobreviventes dos três grupos apresentaram hemocultura negativa. **Conclusões:** O tratamento da peritonite fecal autógena grave com meropenem intravenoso alcançou bons resultados em ratos com seis e doze meses de idade, mesmo considerando os abscessos residuais na cavidade abdominal e torácica. No entanto, 8 dos 10 ratos idosos (80%) não conseguiram superar o desafio infeccioso inicial, provando que o envelhecimento é um fator de risco muito importante no prejuízo da resposta imunológica. Assim, a sepse continua a ser uma situação desafiadora, especialmente em idosos.

Descritores: Peritonite; Sepse; Envelhecimento; Carbapenêmicos; Tratamento; Ratos

ABSTRACT

THERAPEUTICAL OUTCOME OF AGEING RATS WITH SEVERE AUTOGENOUSLY FECAL PERITONITIS TREATED WITH INTRAVENOUS MEROPENEM

Purpose: To evaluate the treatment outcome of severe peritonitis treated with intravenous meropenem in rats with increasing age.

Methods: Thirty Wistar rats stratified in three groups: group I – six month-old; group II – 12 month-old; and group III – 18 month-old, underwent autogenously fecal peritonitis (6 ml/kg rat), were treated with intravenous meropenem at a single dose of 40 mg/kg of rat. The survival animals were followed-up for 45 days. The parameters of the quantitative variables were expressed as means and standard error of the mean (SEM) and $p < 0.05$ was used to reject the null hypothesis. The study was approved by the Ethics Committee on Animal Use. **Results:** Mortality was similar for groups I and II (10%). In group III, 4 of 10 animals died within the first 24 hours and 4 more up to 48 hours. Of interest, even young rats that survived had residual abscesses in both the abdominal and thoracic cavities, although they were living an almost normal life. Except for one rat in group I, all surviving animals of the three groups showed a negative blood culture.

Conclusions: The outcome of severe autogenously peritonitis in rats treated with intravenous meropenem in rats was good in animal with ages of six and twelve months, even considering the residual abscesses in the abdominal and chest cavities. However, 8 of 10 elderly rats (80%) could not overcome the initial infectious challenge, proving that aging is an important risk factor in the loss of immune response. Thus, sepsis continues to be a challenging situation, especially in the elderly.

Keywords: Peritonitis; Sepsis; Aging; Carbapenems; Therapy; Rats

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Comparação entre os pesos dos animais no início do estudo	17
Figura 2	Diferença entre as médias dos pesos dos animais no início do estudo	17
Figura 3	Evolução do peso dos animais durante o seguimento	18
Figura 4	Curva de sobrevida pelo método de Kaplan Meier	18
Figura 5	Vários abscessos residuais aderidos ao mesentério do intestino delgado (grupo I)	19
Figura 6	Petéquias amareladas na superfície do fígado (grupo I)	19
Figura 7	Petéquias amareladas na superfície do fígado e abscesso residual no pulmão direito (grupo I)	20
Figura 8	Múltiplos abscessos residuais no baço (grupo II)	20
Figura 9	Múltiplos abscessos no pulmão esquerdo (grupo II)	20
Figura 10	Abscessos residuais difusos no rim direito, alterando a coloração habitual deste órgão	21
Quadro 1	Escore de morbidade e mortalidade	21
Quadro 2	Resultados das hemoculturas	22
Figura 11	Superfície do pulmão esquerdo mostrando manchas hemorrágicas alaranjadas	23
Figura 12	Visão aproximada do pulmão direito mostrando o órgão hemorrágico e com manchas alaranjadas	23
Figura 13	A - Grande abscesso retroperitoneal no quadrante abdominal inferior esquerdo	24
	B - Depois de abrir o abscesso houve drenagem de massa purulenta necrótica	24
Figura 14	Vários abscessos observados na superfície dos pulmões	24

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CD4	grupamento de diferenciação
CESED	Centro de Ensino Superior e Desenvolvimento
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
Cobea	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DHEAS	sulfato de deidropiandrosterona
DNA	ácido desoxirribonucleico
FCM-CG	Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande
IL-1	interleucina 1
IL-10	interleucina 10
IL-11	interleucina 11
IL-12	interleucina 12
IL-13	interleucina 13
IL-2	interleucina 2
IL-4	interleucina 4
IL-5	interleucina 5
IL-6	interleucina 6
IL-8	interleucina 8
LPS	lipopolissacarídeos
NK	<i>natural killer</i>
PCR	proteína C reativa
SRIS	síndrome da resposta inflamatória sistêmica
TNF- β	fator de necrose tumoral beta
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
UTI	unidades de terapia intensiva

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Apresentação do problema	01
1.2 Justificativa da investigação	01
1.3 Definição dos objetivos	02
1.3.1 Objetivo geral	02
1.3.2 Objetivos específicos	02
2. LITERATURA	03
2.1 Sepses	03
2.2 Envelhecimento e resposta à infecção	06
2.3 Modelos experimentais de indução de sepse abdominal	08
2.4 Microbiologia e antibioticoterapia na sepse de foco abdominal	10
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	13
3.1 Local de estudo	13
3.2 Tipo de Estudo	13
3.3 Seleção	13
3.3.1 Critérios de inclusão	13
3.3.2 Critérios de exclusão	13
3.4 Procedimentos	14
3.4.1 Procedimentos técnicos	14
3.4.2 Procedimentos analíticos	16
3.4.3 Procedimentos éticos	16
4. RESULTADOS	17
5. DISCUSSÃO	25
6. CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27
ANEXOS	44
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	44
ANEXO B – Trabalho publicado na Revista Acta Cirúrgica	45
ANEXO C – Trabalho apresentado no XIV Congresso Internacional Sobradpec 2014	52



INTRODUÇÃO

1.1 Apresentação do problema

Sepse é uma das principais causas de morte no mundo respondendo por 1 a 2% das hospitalizações, 25% das internações em unidades de terapia intensiva e evolui com taxas de mortalidade que atingem até 60% nos casos de choque séptico^{1,2}.

O avanço da idade tem sido apontado como um dos principais determinantes da evolução do quadro séptico. Anormalidades no sistema imune provocadas pelo envelhecimento, a imunossenescência, estão bem determinadas e são as principais responsáveis pela má evolução clínica nessa faixa etária^{3,4}.

Historicamente o manejo das peritonites fecais inclui a administração sistêmica de antibióticos, a remoção mecânica de contaminantes e a restauração da integridade gastrointestinal, embora não exista ainda um tratamento padronizado com claro impacto na redução de sua mortalidade⁵⁻⁷.

Vários modelos experimentais de indução de peritonite têm sido propostos com diferentes estratégias de tratamento. A maioria dos estudos omite a idade cronológica dos animais utilizados destacando apenas seus pesos (250 a 320g) o que aponta para a utilização de animais jovens em sua maioria⁸⁻¹².

Carbapenêmicos têm sido utilizados para o tratamento da sepse grave de foco abdominal por apresentar boa cobertura antibiótica para os principais agentes etiológicos desta entidade. Embora seja descrita resistência de microrganismo em ambiente hospitalar o meropenem é uma das melhores escolhas empíricas para o tratamento da peritonite¹³⁻¹⁵.

1.2 Justificativa da investigação

O estudo é justificado por não existirem trabalhos que avaliem as resposta ao uso de meropenem em modelos experimentais com diferentes idades cronológicas. A maioria dos estudos descreve claramente o peso dos animais estudados, mas ao omitirem a idade podem estar criando um importante viés nos seus resultados.

A idade, em ratos, influencia a imunidade inata alterando o número e a função das células de defesa e é provável que o mesmo ocorra noutros roedores com uma esperada influência na resposta ao tratamento da sepse.

1.3 Definição de objetivos

1.3.1. Objetivo geral

- Investigar a morbi-mortalidade de ratos com peritonite fecal autógena tratados com meropenem intravenoso em diferentes grupos etários.

1.3.2. Objetivos específicos

- Induzir peritonite fecal autógena em ratos Wistar em três diferentes faixas etárias;
- Avaliar o curso clínico da infecção nos três grupos ao longo de um período de observação de 45 dias;
- Avaliar a presença de bacteremia ao final da investigação através de hemoculturas;
- Descrever os achados da necropsia através de inventário da cavidade abdominal e torácica;
- Verificar a morbimortalidade nos três grupos aplicando um escore já validado.



LITERATURA

2.1 Seps

A seps é uma das mais antigas síndromes da história da medicina. Hipócrates afirmava que este era um processo em que “a carne apodrecia, fluidos gasosos eram produzidos e as feridas inflamavam”. Com a devida comprovação da “teoria do germe” de Pasteur a seps passou a ser compreendida como uma invasão sistêmica e consequente difusão dos microrganismos pela corrente sanguínea. No entanto, nem tudo pode ser explicado dessa forma já que alguns pacientes podem falecer mesmo tendo erradicado o patógeno promotor da infecção. Ao que parece é o hospedeiro, e não o patógeno, o principal determinante do processo séptico¹⁶⁻¹⁸.

A seps é definida como infecção comprovada ou suspeitada associada a uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica composta por febre, taquicardia, taquipneia, leucocitose, dentre outros¹⁹. Seps grave, por sua vez, é caracterizada pela presença de disfunção dos variados órgãos e o choque séptico é reconhecido na seps com hipotensão (pressão arterial sistólica < 90 mmHg ou pressão arterial média < 70 mmHg) apesar da adequada reposição volêmica^{18,20-22}.

A incidência de seps é crescente e, nos Estados Unidos, representa 10% de todas as admissões em unidades de terapia intensiva (UTI) alcançando 750.000 casos por ano com taxas de mortalidade que variam de 30% a 70%^{1,23}. No mundo inteiro são escassos os números que refletem a incidência de seps. Extrapolando-se a incidência americana para o mundo, estima-se em 19 milhões de casos por ano o que, provavelmente, está subestimado^{1,2,24,25}.

Dentre as principais causas de seps destaca-se a pneumonia, que responde por metade de todos os casos, seguida por infecções intrabdominais e urinárias¹. *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* são as bactérias Gram positivas mais comumente isoladas, enquanto *Escherichia coli*, espécies de *Klebsiella* e *Pseudomonas aeruginosa* predominam entre as Gram negativas. Da década de 70 para os dias atuais as infecções por patógenos gram positivos superaram em incidência as infecções por Gram negativo^{23,26-29}.

A fisiopatologia da seps é explicada pela interação entre o microorganismo e as respostas inapropriadas de natureza imune, inflamatória e da coagulação do paciente^{30,31}. A síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SRIS) é classicamente descrita na seps e pode

ser detectada quando estão presentes dois dentre os seguintes critérios: (1) temperatura corporal maior que 38°C ou menor que 36°C, (2) frequência cardíaca acima de 90 batimentos por minutos, (3) frequência respiratória acima de 20 incursões por minutos ou pressão parcial de CO₂ menor que 32 mmHg ou necessidade de ventilação mecânica e (4) contagem de leucócitos acima de 12.000/ml ou abaixo de 4.000/ml ou mais de 10% de formas imaturas²⁰. A SRIS é descrita como um estado hiperinflamatório representado por elevados níveis de mediadores pró-inflamatórios com o desenvolvimento de uma síndrome de disfunção multiorgânica¹⁹. O elemento central nos eventos fisiopatológicos da sepse é a inadequação da resposta do corpo humano à intensidade do estímulo patogênico o que, em última instância, leva a uma disfunção do vários órgãos. Esta inadequação resulta em transtornos que variam de um perfil pró-inflamatório a um cenário anti-inflamatório associado geralmente a uma coagulação anormal, disfunção na microcirculação e consequente lesão e morte celular³²⁻³⁶.

Inicialmente os patógenos ativam as células do sistema imune através de receptores de cinco classes principais diferenciadas com base nas suas características estruturais: receptores *toll-like*, receptores de lecitina do tipo C, receptores *NOD-like*, receptores de helicase *RIG-like* e receptores de varredura³⁷. Esses receptores, presentes nas células fagocitárias, reconhecem as estruturas presentes nos diversos microrganismos, levam a um aumento da transcrição de genes inflamatórios e ativam a imunidade inata. Uma vez ativados os receptores, observa-se uma alteração do comportamento da célula que sai de seu estado latente e entra num estado ativado. Os macrófagos e neutrófilos ativados são capazes de fagocitar partículas que se combinam com seus receptores e ainda promovem a liberação de citocinas e quimiocinas que amplificam a resposta imune. Ressalte-se que polimorfismos nesses receptores podem ter implicação decisiva na evolução para sepse grave e choque séptico^{38,39}.

Buscando auxiliar a resposta imune o sistema complemento é ativado. Ele é composto por um grupo de cerca de 35 a 40 proteínas e glicoproteínas presentes no plasma e nas superfícies das células que são ativadas em série depois da ligação de determinados polissacarídeos microbianos. A ativação do complemento resulta na ligação de seus componentes à superfície da célula bacteriana que pode facilitar sua captação pelos fagócitos. Outra característica igualmente importante é que fragmentos do complemento podem atuar como fatores quimiotáticos de maneira a dirigir os fagócitos ao microrganismo invasor, processo conhecido como opsonização^{40,41}.

Após essa fase de reconhecimento vão se suceder vários eventos de ativação celular e produção de citocinas cujo resultado será a própria síndrome de resposta inflamatória sistêmica. Serão produzidas inúmeras citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina 1 (IL-1), 2 (IL-

2), 6 (IL-6), 8 (IL-8), 12 (IL-12), TNF- α e TNF- β , evento determinante no desenvolvimento da sepse. Por outro lado algumas citocinas anti-inflamatórias como 4 (IL-4), 5 (IL-5), 10 (IL-10), 11 (IL-11) e 13 (IL-13), também são produzidas o que possibilita o desenvolvimento de anergia e alentecimento da resposta aos agentes etiológicos, contexto de imunossupressão conhecido como síndrome da resposta anti-inflamatória compensatória. É o balanço entre a produção desses mediadores que determinará a evolução dos quadros de sepse⁴²⁻⁴⁴.

Algumas proteínas plasmáticas descritas coletivamente como proteínas de fase aguda aumentam dramaticamente suas concentrações em resposta aos mediadores de alarme iniciais. Esse grupo inclui a proteína C reativa (PCR), a lecitina de ligação de manose, o componente P amilóide sérico e a própria IL-1 derivada dos macrófagos que é liberada quando há infecção ou lesão dos tecidos. Todas essas proteínas atuam como moléculas solúveis de reconhecimento e conseguem ligar-se diretamente aos agentes infecciosos atuando como opsoninas. A dosagem de alguns desses reagentes pode ser útil para orientar o tratamento e determinar o prognóstico em quadros de sepse⁴⁵.

Importantes alterações na coagulação podem ser observadas nos quadros de sepse. A deposição de fibrina é impulsionada pela coagulação através do fator tecidual, por mecanimos anticoagulantes prejudicados (proteína C, proteína S e antitrombina III) e pela depressão do sistema fibrinolítico³⁵. Esse cenário pode culminar com o quadro de coagulação intravascular disseminada caracterizada por ativação intravascular da coagulação, formação e deposição da fibrina na microvasculatura, consumo de plaquetas e alterações na fibrinólise. A consequência da hemostasia alterada é a obstrução dos vasos e redução do fluxo de sangue em inúmeros órgãos⁴⁶⁻⁴⁹.

A incidência e a gravidade da sepse aumentam diretamente com a idade. A média de idade dos pacientes com sepse grave está entre 60 e 65 anos na maioria dos estudos sendo 13 vezes mais comum nos paciente acima de 65 anos de idade³². Estudos epidemiológicos da década de 90 mostraram um aumento da incidência de sepse grave em jovens, especialmente ao redor dos 30 anos de idade, que foi atribuído à epidemia do vírus da imunodeficiência humana e suas condições associadas²³. Com o controle da epidemia na maioria do países essa tendência foi revertida. Microrganismos gram negativos são mais frequentes em pacientes idosos. *Escherichia coli* tem sido apontada como a etiologia mais comum de sepse nessa faixa etária enquanto que *Staphylococcus aureus* foi a etiologia mais comum em jovens com bacteremia adquirida na comunidade. A fonte de infecção também é distinta no idoso sendo mais comum a infecção do trato urinário como causa da sepse. Evidências apontam que a qualidade de vida é reduzida substancialmente naqueles que sobrevivem a um episódio^{50,51}.

Alguns estudos apontam para uma maior incidência de sepse em negros, sugerindo uma possível predisposição genética determinada por certos polimorfismos. Por outro lado, uma maior percentagem de negros vivendo na pobreza pode explicar parcialmente esse achado^{32,50}.

Homens são mais propensos a desenvolver sepse quando comparados com as mulheres²³. Não está claro se essa diferença se deve à maior prevalência de comorbidades no homem ou se as mulheres são protegidas quanto às alterações inflamatórias da sepse grave. A ausência de associação entre sepse grave e menopausa não apoia a hipótese de que tais diferenças estariam relacionadas aos hormônios sexuais. A fonte de infecção também é distinta nos sexos: em homens predominam as infecções do trato respiratório e nas mulheres as infecções do trato urinário. A mortalidade, por sua vez, não parece ser diferente entre os sexos^{32,50,52}.

2.2 Envelhecimento e resposta à infecção

O envelhecimento se caracteriza pela perda progressiva das funções orgânicas que inexoravelmente acompanha o avanço da idade de quase todos os seres vivos. Uma teoria que explica esse processo postula que a senescência limita o tamanho das populações e acelera o aparecimento de novas gerações com vistas a promover uma melhor adaptação a um meio ambiente sempre em constantes mudanças⁵³. Outros autores defendem a “pleiotropia antagônica” onde genes pleiotrópicos com bons efeitos nas primeira fase da vida poderiam ser favorecidos pela seleção, mesmo se esses genes apresentarem efeitos deletérios nas idades mais avançadas⁵⁴. A alocação dos recursos metabólicos para a manutenção da vida prioriza o dispêndio energético para as primeiras fases da vida envolvidas com a reprodução das espécies, fazendo com que as idades mais avançadas sofram, por vezes, com um desequilíbrio de recursos energéticos para promover, por exemplo, o reparo do DNA^{55,56}.

O sistema imune é regulado por vários hormônios como o hormônio do crescimento, os esteroides adrenais e os hormônios sexuais⁵⁷. Em grande parte, a imunossenescência é reflexo das profundas modificações do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal que se processa com o avanço da idade. Em idosos, observa-se uma redução de até 90% nos níveis de sulfato de deidroepiandrosterona (DHEAS), sabidamente um estimulante do sistema imunológico. Os níveis de cortisol, um reconhecido imunossupressor, mantêm-se elevados nessa faixa etária⁵⁸⁻⁶⁰.

O envelhecimento é acompanhado por um *status* de inflamação crônica de baixo grau, o chamado *inflamm-aging*, onde se verifica um aumento constante da resposta inflamatória

basal, representada por níveis séricos aumentados de proteína C reativa (PCR), interleucina 6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (FNT- α)^{3,4,61}. Este parece ser um evento que ocorre universalmente e predispõe o idoso a desenvolver uma aterosclerose mais acentuada com seus previsíveis desdobramentos. Essa inflamação crônica pode também predispor ao aparecimento da resistência à insulina nos músculos e tecidos adiposos bem como comprometer a homeostase celular⁶²⁻⁶⁸.

A imunossenescência se associa a um progressivo declínio da resposta imunológica inata e adaptativa com consequente aumento da suscetibilidade a infecções, doenças autoimunes e câncer. Diferentes tipos celulares são acometidos tanto na medula óssea, no timo como no sangue periférico. O sistema inato, que consiste principalmente dos fagócitos (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas), dos mastócitos, eosinófilos e das células *natural killer* (NK), sofre menos que o sistema adaptativo, representado pelos linfócitos B e T^{67,69-73}.

Os neutrófilos, defesa imune primária contra infecções, embora não apresentem diminuição em seu número com o avançar da idade, apresentam uma diminuição de sua capacidade quimiotática e promovem uma lesão tecidual maior, reflexo da liberação de suas enzimas proteolíticas⁷⁴⁻⁷⁶. Outros fatores alterados com a idade são a produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio e a sua capacidade fagocítica. Curiosamente o número de células NK aumenta com a idade, embora a citotoxicidade e a produção de citocinas e quimiocinas como a interleucina 8 (IL-8), esteja reduzida. Isto pode ser explicado pela queda de zinco encontrada nos idosos já que a sua suplementação pode melhorar as funções dessas células. Outras funções das células NK, como a secreção de quimiocinas ou interferon-gama (IF γ) em resposta à interleucina 2 (IL-2) também estão diminuídas nos idosos. As células dendríticas, os principais apresentadores de antígenos do sistema imune, também tem sua função diminuída com o envelhecimento⁷⁷⁻⁸⁰.

A resposta imune adaptativa, constituída pelos linfócitos B, T e a produção de anticorpos também exibe um declínio considerável no envelhecimento. Isto explica a capacidade diminuída dos idosos de responder à vacinação. Os linfócitos B apresentam-se em menor número e com modificações no repertório de receptores de superfície e vazão dos precursores na medula óssea. Além disso, alterações no processo de diferenciação dos linfócitos B em plasmócitos geram uma menor diversidade^{81,82}. A produção de anticorpos contra novos antígenos fica reduzida, embora a imunidade humoral contra antígenos de memória permaneça praticamente intacta. O número de linfócitos T permanece constante durante o envelhecimento embora sua funcionalidade esteja comprometida. Nas células T CD4⁺ observa-se reduzida ativação, diferenciação e expansão após estímulo, além de comprometida sua função de auxílio

às células B defeituosas. As células T CD8⁺ por sua vez exibem resposta reduzida a novos estímulos, declínio na diversidade de repertório, geração de memória defeituosa e redução de sua resposta citotóxica com o envelhecimento⁸³⁻⁸⁸.

2.3 Modelos experimentais de indução de sepse abdominal

Diferentes modelos animais para desenvolvimento de sepse têm sido desenvolvidos com o objetivo de simular as alterações fisiopatológicas encontradas em pacientes sépticos. Os modelos experimentais mais comumente utilizados apresentam duas estratégias básicas : (1) a injeção direta na cavidade abdominal de bactérias ou componentes microbianos como os lipopolissacarídeos (LPS) ou (2) originar um foco séptico pela injeção ou liberação de fezes na cavidade peritoneal^{8,9,11,12,89}. Diferentes espécies animais têm sido utilizadas com esse propósito incluindo ratos, camundongos, coelhos, cachorros, porcos, ovelhas e primatas não humanos⁹⁰.

A administração sistêmica de uma endotoxina como modelo de sepse se baseia no conceito de que as características clínicas apresentadas por um paciente séptico decorrem da resposta imune e inflamatória a determinados elementos bacterianos. A endotoxina, como comumente o LPS é reconhecido, é parte da estrutura externa de bactérias gram negativas. A infusão endovenosa de LPS ou a sua instilação na cavidade abdominal causa os sintomas típicos de sepse como taquicardia, febre e leucocitose⁹¹. Níveis detectáveis de LPS são identificados em mais de 75% com sepse nas UTI⁹². A hipótese de que as endotoxinas têm um papel importante na sepse é apoiada por muitos estudos que demonstram que a administração de antibióticos pode levar a uma liberação súbita e maciça de endotoxinas de bactérias mortas com piora hemodinâmica significativa⁹³⁻⁹⁷.

A elevação de determinadas citocinas no modelo animal apresenta-se distinta e, assim sendo, a administração de endotoxina em animais de experimentação pode não refletir acuradamente a sepse em humanos⁹⁸. Talvez por isso o bloqueio da endotoxina na sepse de humanos como intervenção terapêutica tenha falhado em mostrar benefício⁹⁹. Além disso, a endotoxina não está presente em bactérias gram positivas, embora a mortalidade por infecções promovidas por esses agentes seja semelhante às bactérias gram negativas⁹⁴.

A administração endovenosa de bactérias pode também ser bastante útil como modelo de indução de sepse já a que a bacteremia tem um importante papel na evolução da doença. Observa-se que as hemoculturas apresentam maior positividade quanto maior for a gravidade do quadro clínico variando de 17% na sepse, 25% na sepse grave e 67% no choque séptico⁹⁰.

As respostas apresentadas variam a depender da dose utilizada (número de unidades formadoras de colônia). Pode-se observar aumento do débito cardíaco, taquicardia, febre e taquipneia até mesmo instalação de choque, insuficiência respiratória e morte¹⁰⁰⁻¹⁰³. Uma vez que os pacientes não são submetidos a bacteremias extremas no curso da sepse, e sim a uma exposição intermitente e persistente, vários autores questionam a validade desse modelo^{90,104}.

A sepse de foco abdominal é melhor induzida pela inoculação de material fecal ou de uma cultura de bactérias dentro da própria cavidade ou da perfuração do intestino⁹². A ligadura e punção do ceco foi inicialmente descrita em 1979 e atualmente é utilizada com pequenas modificações¹⁰⁵⁻¹⁰⁷. Com o animal anestesiado (geralmente ratos ou camundongos) é feita uma laparotomia e o ceco é cuidadosamente isolado. Faz-se a ligadura cecal logo abaixo da válvula íleocecal e então punciona-se o ceco com uma agulha. A cavidade é fechada e de 10 a 16 horas depois já podem ser vistas manifestações de sepse. Esse modelo tem sido intensamente utilizado por ser um método de grande versatilidade permitindo a graduação da gravidade da infecção mediante o número e tamanho das punções realizadas. Além disso, a ligadura do ceco provê uma fonte de tecido necrótico que é frequentemente observado na sepse clínica. Apesar de sua relevância e de seu uso difundido uma das maiores limitações desse método é sua consistência e reprodutibilidade. Várias versões da técnica original são aplicadas o que, por vezes, impossibilita a comparação entre os diversos estudos^{105,108,109}.

A inoculação de material fecal dentro da cavidade abdominal como modelo de indução de peritonite e sepse se iniciou na década de 70 quando pesquisadores tentavam separar os fatores associados com o desenvolvimento da peritonite daqueles associados à formação do abscesso^{10,110,111}. Esse modelo permite também a graduação da gravidade da infecção através da inoculação de cargas distintas de fezes, porém, a instalação súbita do material fecal na cavidade abdominal e a ausência de material necrótico também distanciam esse modelo da fisiopatologia encontrada da peritonite^{112,113}.

Nenhum modelo experimental para desenvolvimento de sepse isoladamente pode prover uma evidência definitiva da eficácia de um determinado agente terapêutico. A doença humana é bastante heterogênea e as condições experimentais controladas se distanciam desse cenário. A escolha do modelo a ser adotado está na dependência dos aspectos e objetivos a serem estudados¹⁰⁹.

2.4 Microbiologia e antibioticoterapia na sepse de foco abdominal

O conceito hoje bem estabelecido de que o intestino é um potencial reservatório para infecções sistêmicas remonta à década de 40¹¹⁴. Posteriormente o mecanismo de translocação bacteriana foi proposto para explicar quadros de sepse em pacientes com falência de múltiplos órgãos onde ocorre uma deterioração da barreira intestinal¹¹⁵.

As infecções abdominais difusas, denominadas de peritonite, podem ser classificadas em primárias, secundárias e terciárias. A peritonite primária, também chamada de espontânea, é uma infecção geralmente monomicrobiana, ocorre por contaminação via hematogênica, linfática ou transmural (translocação bacteriana) e não se associa a perda da integridade física do trato gastrointestinal¹¹⁶. Na forma secundária, mais comum, há uma quebra da barreira mucosa por um envolvimento intra-abdominal próprio (apendicite, diverticulite, colecistite, etc) ou decorrente de procedimentos cirúrgicos e traumatismos abdominais¹¹⁷. A peritonite terciária é uma entidade pobremente definida e é reconhecida como um processo infeccioso do abdome em que a deficiência dos mecanismos de defesa do abdome e a falta de controle do processo infeccioso determinam a peritonite difusa persistente mesmo após um tratamento adequado^{118,119}.

Abscessos intra-abdominais podem se desenvolver após a instalação de uma peritonite secundária. Eles servem para limitar a difusão do processo infeccioso e são o resultado do combate do hospedeiro em resposta à peritonite representando uma evolução temporal da infecção mais do que um processo patológico distinto. Os abscessos representam a superioridade dos mecanismos de defesa enquanto que infecções difusas, pobremente localizadas, típicas da peritonite terciária, sinalizam a falência dessa disputa⁷.

A etiologia microbiana das infecções intra-abdominais está na dependência do nível de rompimento do peritônio e dos órgão acometidos. A flora gastro-intestinal é a principal fonte dessas infecções. A porção superior (estômago, duodeno, jejuno e íleo superior) contém relativamente poucos microrganismos (10^3 a 10^4 organismos por grama de tecido) e a presença de bactérias anaeróbias é menor. A maioria é composta de cocos gram positivos, particularmente estreptococos, e lactobacilos. São considerados uma flora de transição da cavidade oral e não verdadeiros colonizadores do trato gastrointestinal superior^{120,121}. No intestino delgado mais distal os cocos gram positivos ainda se apresentam, mas bacilos aneróbicos gram negativos começam a ser observados. No íleo distal as bactérias já contam 10^8 organismos por grama de tecido chegando a 10^{11} no cólon. Nesta região os microrganismos anaeróbicos predominam até 1000 vezes mais do que os aeróbicos^{122,123}.

A maioria das infecções intra-abdominais resultam de perfurações do trato gastrointestinal. *Escherichia coli* é o microrganismo mais comumente isolado de pacientes em mais

de 50% dos casos¹²⁴. Muitos outros bacilos entéricos gram negativos são detectados, incluindo espécies de *Klebsiella* e *Enterobacter*. Bacilos gram negativos não coliformes, particularmente *Pseudomonas aeruginosa*, podem também ser isoladas nessas infecções¹²⁵.

Cocos gram positivos são frequentemente encontrados em infecções intra-abdominais sendo a maioria estreptococos do tipo *viridans*. Espécies de *Enterococcus* são isolados menos frequentemente em 10 a 20% dos pacientes¹²⁶. A maioria das cepas de enterococos isoladas em infecções intra-abdominais adquiridas na comunidade são *Enterococcus faecalis* sensíveis à penicilina¹⁵.

Microrganismos anaeróbicos são importantes componentes da maioria das infecções intra-abdominais embora não sejam isolados devidos às técnicas laboratoriais aplicadas pois seu isolamento exige métodos de colheita, de transporte e de cultivo dos espécimes apropriados. O mais prevalente é o *Bacteroides fragilis*, presente em até 50% dessas infecções¹⁴. A presença de bactérias anaeróbicas é a principal causa da formação de abscessos na maioria dos sítios anatômicos. A explicação biológica é que a cápsula polissacarídica, que tem sido bem estudada em *B. fragilis*, pode ser abscessogênica¹²⁷.

Infecções hospitalares apresentam um microbiologia distinta. A própria flora gastrointestinal normal é alterada no ambiente hospitalar. Quando comparada com as infecções comunitárias, as infecções intra-abdominais hospitalares apresentam uma frequência maior de bactérias gram negativas, com *E. coli* menos comumente isolada e *Enterobacter* e *Pseudomonas* mais frequentemente encontradas. Observa-se ainda redução da frequência de isolamento de estreptococos, aumento dos *Enterococcus* e dos fungos, sendo predominantemente *Candida albicans*^{128,129}.

O tratamento da peritonite inclui o restabelecimento da integridade gastrointestinal, a remoção mecânica dos contaminantes e a antibioticoterapia. Esta última é uma peça fundamental neste contexto, especialmente quando o foco exato não está muito bem definido. O princípio geral que norteia a escolha o antibiótico é que ele seja efetivo contra os bacilos gram negativos aeróbicos, cocos gram positivos aeróbicos e os microrganismos anaeróbicos mais comumente encontrados nesse cenário^{6,13}.

Inúmeras são as estratégias antibióticas para o tratamento das infecções intra-abdominais. Existem propostas para uso de uma droga única como carbapenêmicos (doripenem, imipenem, ertapenem e meropenem), fluoroquinolonas (moxifloxacino) ou uso de betalactâmicos com inibidor de beta-lactamase (ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam e ticarcilina/ácido clavulânico). Outros esquemas prevêem a combinação de dois agentes como cefalosporina de terceira geração associado com metronidazol, aztreonam com clindamicina,

fluoroquinolonas associadas com metronizadol ou aminoglicosídeos com metronidazol ou clindamicina¹³⁰. Vários fatores influenciam a escolha do esquema antibiótico como eficácia, toxicidade e custo, embora o mais determinante seja a eficácia. Apesar dos inúmeros estudos comparativos, não existe evidência clara da superioridade de um esquema sobre o outro¹³¹⁻¹³³.

A resistência bacteriana se dá por diferentes mecanismos como presença de enzimas que inativam a droga, mutação no alvo do agente antimicrobiano, modificações pós transcricionais do alvo do agente antimicrobiano, redução da permeabilidade a este agente, dentre outros^{134,135}. Estudos retrospectivos têm identificado a resistência bacteriana como um fator de risco para a falência ao tratamento e mortalidade em pacientes com infecções intra-abdominais. O uso excessivo de antibióticos, incluindo os de amplo espectro, tem levado à seleção de linhagens de microrganismos cada vez mais resistentes⁷.

Com o surgimento dos carbapenêmicos como escolha terapêutica empírica no tratamento de infecções graves por *P. aeruginosa* e espécies de *Acinetobacter*, o uso desta classe tem sido ameaçado pelo aumento da incidência de β -lactamases que podem hidrolisar esta classe antimicrobiana gerando resistência. Existem evidências de uma relação direta entre o uso desses antibióticos e o aparecimento de enterobactérias resistentes, embora essa ainda seja uma das melhores e mais seguras opções para a sepse de foco abdominal^{136,137}.



CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 Local de estudo

Núcleo de Investigação Experimental e Biotério da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande (FCM-CG).

3.2 Tipo de estudo

Prospectivo, longitudinal, analítico e de intervenção.

3.3 Seleção

3.3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos 30 ratos machos adultos Wistar (*Rattus Novergicus*, *Rodentia Mammalia*), sem qualquer doença ou agravo provenientes da colônia de criação do biotério da Faculdade de Ciências Médicas de Campina Grande (FCM-CG). Os animais foram divididos em três grupos:

- **Grupo 1** – ratos jovens saudáveis com 6 meses de idade, pesando entre 355 e 488 gramas;
- **Grupo 2** – ratos maduros hígidios com 12 meses de idade, com pesos entre 365 e 533 gramas; e
- **Grupo 3** – ratos maduros com idade 18 meses e pesos entre 390 gramas e 630 gramas.

3.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos os animais que no momento da indução da peritonite por meio da injeção de solução fecal apresentassem sinal de qualquer fluido orgânico no aspirado da cavidade peritoneal. Também seriam excluídos os animais que desenvolvessem desnutrição ou que tivessem nas fezes qualquer sinal de processo inflamatório, incluindo pus ou sangue.

3.4 Procedimentos

3.4.1 Procedimentos Técnicos

Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno com dimensão de 430x430x200 mm (CxLxA) num ambiente com temperatura de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, em ciclo de luz/escurecimento (12 h) e tiveram livre acesso a alimentação e água *ad libitum*. Um rato foi excluído por ter apresentado malformação dentária e desenvolvido desnutrição. Ele foi trocado por outro rato da mesma ninhada.

Os ratos foram divididos em três grupos estratificados segundo a idade cronológica: grupo I – 6 meses, grupo II - 12 meses e grupo III – 18 meses. No primeiro dia do seguimento (D1) foi induzida a peritonite por inoculação intraperitoneal de uma suspensão fecal autógena a 10%. Dois gramas de fezes foram coletadas de cada rato individualmente e dissolvidos em 20mL de solução salina a 0,9%. A mistura era homogeneizada e filtrada com uma gaze para remoção das grandes partículas a fim de permitir sua livre passagem pela agulha. Foi então injetada 6mL/Kg da suspensão na cavidade intraperitoneal, no quadrante ilíaco esquerdo, usando uma agulha de 30 x 1,2 mm.

No oitavo dia (D8) foi administrado meropenem endovenoso em dose única de 40mg/Kg. Este protocolo foi realizado nos grupos I e II, porém no grupo III, dada sua alta mortalidade nos primeiros dois dias, a medicação foi administrada 24 horas após a indução da peritonite. Neste terceiro grupo apenas seis ratos sobreviveram às primeiras 24 horas e, após 72 horas, apenas dois continuavam vivos tendo recebido mais duas doses de meropenem.

Diariamente os animais eram observados por uma médica veterinária e submetidos a avaliação do peso corporal, temperatura, frequência respiratória e dos pelos com o objetivo de detectar sinais de infecção grave.

Os animais que sobreviviam até o 45º dia após a indução da peritonite foram eutanasiados com a administração de cloridrato de Ketamina (50mg/kg) e Xilazina (10mg/kg).

Na sequência, foi realizada incisão da linha média abdominal e acesso à cavidade peritoneal. Realizada a inspeção da cavidade para identificar abscessos, aderências e outros sinais macroscópicos de infecção como pus em cavidade peritoneal. Foi realizada punção da aorta abdominal com agulha 30 x 1,2 mm e aspirado 2 mL de sangue. Do aspirado 1 mL foi desprezado e 1 mL injetado na solução de hemocultura (Hemocult I Pediátrico, Laborclin). Por fim, a cavidade torácica foi acessada por meio de incisão na linha média do tórax e no osso

esterno. Realizada a documentação fotográfica de todos os achados. Os animais que morreram antes do seguimento previsto também eram submetidos ao mesmo procedimento.

Para estratificação da morbidade e mortalidade foi usado um protocolo já validado previamente.

Escore	Estratificação da morbidade e mortalidade dos animais
0	animais que morreram de choque séptico nas primeiras 24 horas após indução da peritonite fecal.
1	animais que morreram entre 24 e 48 horas após a indução da peritonite.
2	animais que morreram entre 48 horas e oito dias após a indução da peritonite, com sinais clínicos óbvios de infecção grave.
3	animais que morreram entre o 8º e o 45º dia após a indução da peritonite, com sinais clínicos óbvios de infecção grave.
4	animais que sobreviveram até o 45º dia, mas ainda apresentam hemocultura positiva, com sinais clínicos moderados de infecção e, após a eutanásia, apresentam abscessos dentro das cavidades torácica e abdominal.
5	animais que sobreviveram até o 45º dia após a indução da peritonite e ainda apresentam hemocultura positiva, sem sinais clínicos de infecção, mas, após a eutanásia, exibem abscessos dentro das cavidades torácica e abdominal.
6	animais que sobreviveram até o 45º dia após a indução da peritonite fecal e ainda têm hemocultura positiva, sem sinais clínicos de infecção, e após a eutanásia abscessos são observados apenas na cavidade abdominal.
7	animais que sobreviveram até o 45º dia após a indução da peritonite fecal, mas com hemocultura negativa. Não apresentam sinais clínicos de infecção e, após a eutanásia, abscessos são observados dentro das cavidades abdominal e torácica.
8	animais que sobreviveram até o 45º dia após a indução da peritonite fecal, apresentam hemocultura negativa, e após a eutanásia abscessos são observados apenas na cavidade abdominal.
9	animais que sobreviveram até o 45º dia após a indução da peritonite fecal, apresentam hemocultura negativa, e após a eutanásia apenas um único e pequeno abscesso é observado na cavidade abdominal.
10	animais que sobreviveram até o 45º dia após a indução da peritonite fecal, apresentam hemocultura negativa, e após a eutanásia nenhum abscesso cavitário é observado.

3.4.2 Procedimentos analíticos

As variáveis quantitativas foram expressas por suas médias e erro padrão da média. As variáveis qualitativas foram expressas por suas frequências absolutas e relativas.

Foi utilizado o teste de Mann Whitney para avaliar possível diferença entre as médias dos escores de morbi-mortalidade.

Para a comparação entre as médias dos pesos dos animais nos três grupos, foi utilizada a análise de variância (ANOVA).

O teste de Mantel-Cox foi utilizado para comparação de sobrevida entre os três grupos de animais e foi construída uma curva de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier.

O teste do qui-quadrado foi utilizado para avaliar possíveis diferenças entre frequências de alterações macroscópicas nos grupos estudados.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa *Graphpad Prism for Windows* (San Diego, CA, www.graphpad.com) versão 6.

Foi estabelecido o valor de $p < 0,05$ para rejeição da hipótese de nulidade.

3.4.3 Procedimentos éticos

Os ratos receberam cuidados em concordância com os “Princípios de cuidados com animais de laboratório”, respeitando-se os “Princípios éticos na experimentação animal do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal” (Cobea)¹³⁸. O projeto de investigação foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA/CESED) – protocolo número 0022/03092012-1 (Anexo A).



RESULTADOS

Os grupos de 6 meses (grupo I), 12 meses (grupo II) e 18 meses (grupo III) apresentaram as médias de peso no início do experimentos de $405,5 \pm 37,5$, $456,2 \pm 57,7$ e $531,3 \pm 81,5$, respectivamente. A média do grupo mais idoso foi significativamente maior ($p=0,004$ - ANOVA) que os grupos mais jovens (figura 1 e 2). Não houve diferença entre as médias dos pesos entre os grupos mais jovens ($p=0,1757$).

Comparação de peso entre os grupos

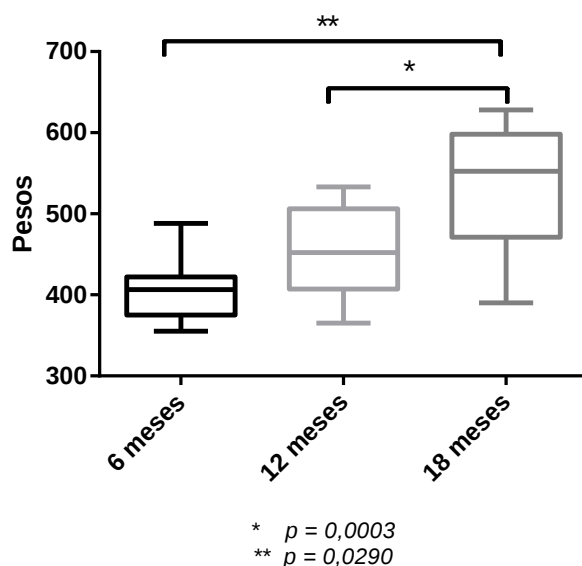


Figura 1 – Comparação entre os pesos dos animais no início do estudo

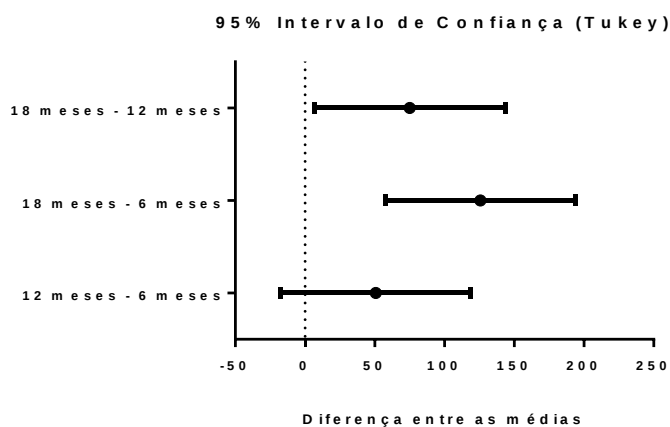


Figura 2 – Diferença entre as médias dos pesos dos animais no início do estudo

A aferição diária dos pesos dos animais mostrou um comportamento semelhante com perda inicial, mais intensa ao redor do 15º dia, e recuperação no restante do seguimento (figura 3).

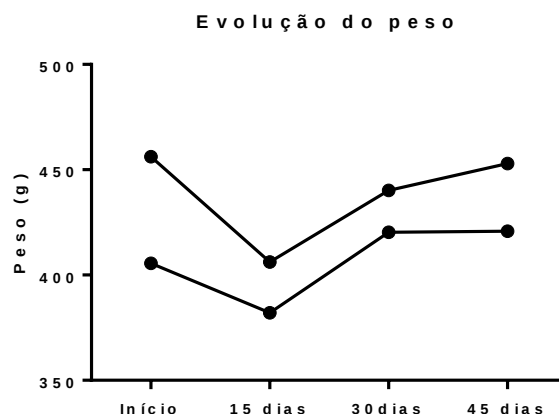


Figura 3 – Evolução do peso dos animais durante o seguimento

A mortalidade entre os grupos I e II não foi diferente. Apenas 1 rato morreu em cada grupo dentro da primeira semana de seguimento. No terceiro grupo 8 dos 10 animais morreram na primeira semana, sendo 4 deles nas primeiras 24 horas depois da indução da peritonite (figura 4). A diferença no tempo de sobrevida entre o grupo III e os outros foi significativa com $p = 0,0002$ pelo teste *log-rank* (Mantel-Cox).

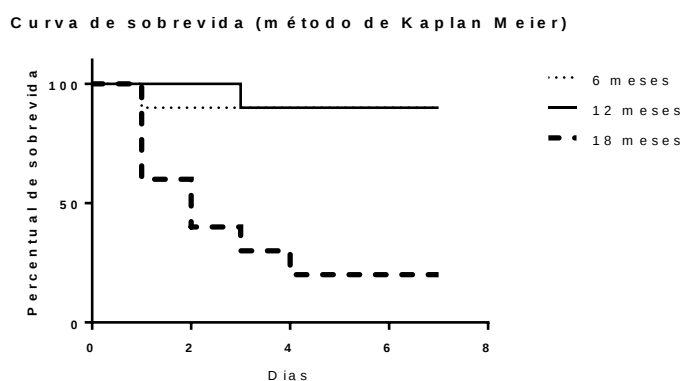


Figura 4 – Curva de sobrevida pelo método de Kaplan Meier

No inventário das cavidades abdominal e torácica, os achados mais comumente observados foram : a) aderências entre os intestino delgado e o peritônio parietal ; b) múltiplos abscessos pulmonares ; c) lesões cicatriciais de abscessos nos pulmões ; d) petéquias no fígado ; e) abscessos retroperitoneais ; f) petéquias nos rins ; g) Abscessos infrarrenais ; h) abscessos renais ; i) abscessos mesentéricos únicos ou múltiplos e j) abscessos esplênicos. Figuras 5 a 10.

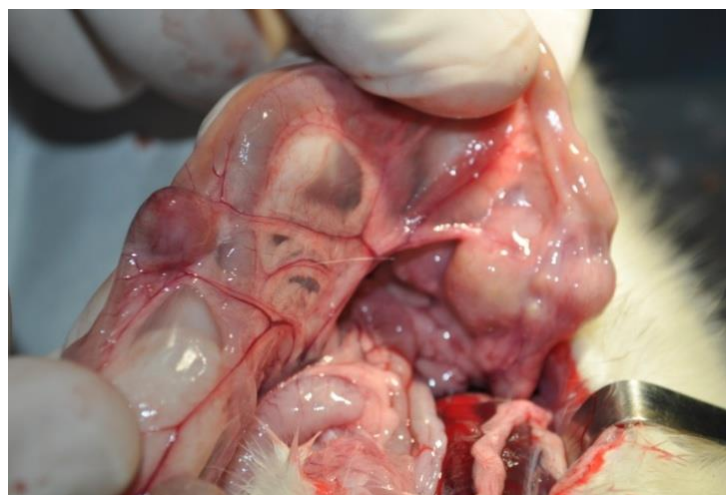


Figura 5 – Vários abscessos residuais aderidos ao mesentério do intestino delgado (grupo I)

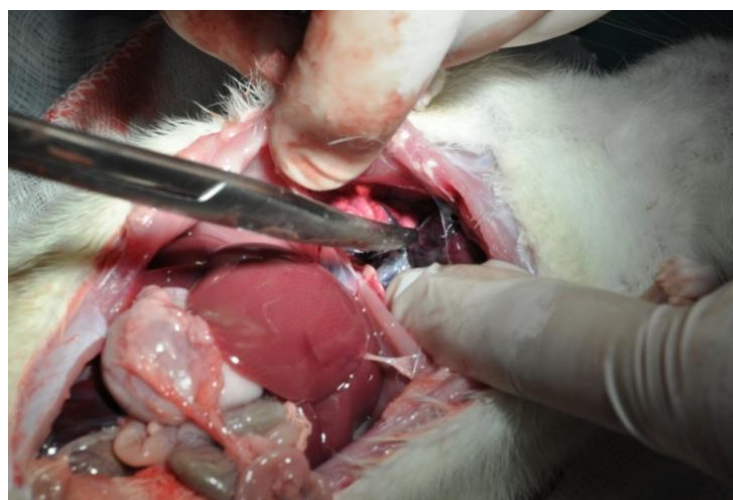


Figura 6 – Petéquias amareladas na superfície do fígado (grupo I)



Figura 7 – petéquias amareladas na superfície do fígado e abscesso residual no pulmão direito (grupo I)



Figura 8 – Múltiplos abscessos residuais no baço (grupo II)

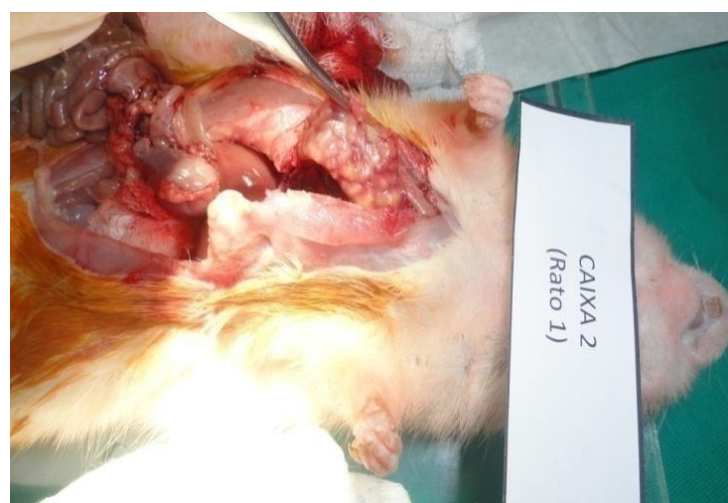


Figura 9 – Múltiplos abscessos no pulmão esquerdo (grupo II)

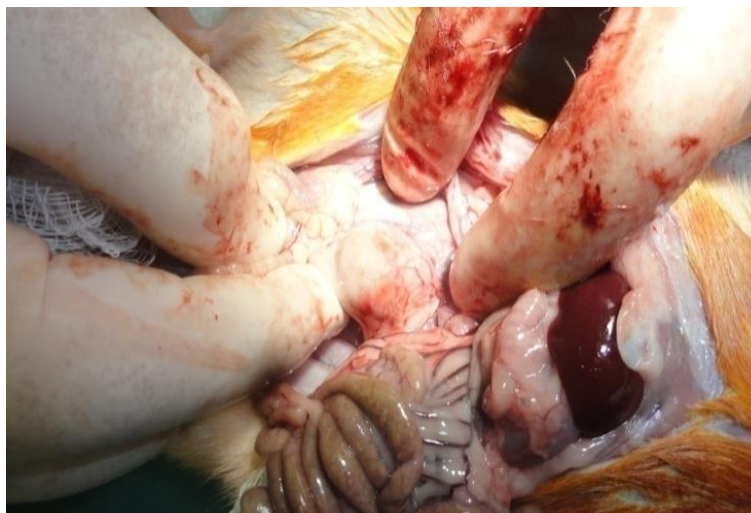


Figura 10 – Abscessos residuais difusos no rim direito, alterando a coloração habitual deste órgão.

Os achados do grupo II mostraram-se mais expressivos quando comparados ao grupo I, embora não tenha havido diferença estatisticamente significativa entre os escores de morbidade e mortalidade {(Grupo I – $7,400 \pm 0,968$ e Grupo II – $7,700 \pm 0,803$) – teste de Mann Whitney = 47,50 - $p=0,8657$ } quadro 1.

Quadro 1 – Escore de morbidade e mortalidade

Grupo I		Grupo II	
Rato 1	6	Rato 1	8
Rato 2	7	Rato 2	2
Rato 3	10	Rato 3	7
Rato 4	7	Rato 4	10
Rato 5	10	Rato 5	6
Rato 6	0	Rato 6	10
Rato 7	10	Rato 7	10
Rato 8	10	Rato 8	10
Rato 9	7	Rato 9	7
Rato 10	7	Rato 10	7

No grupo III (animais com 18 meses), 4 ratos (40%) morreram nas primeiras 24 horas após a indução da peritonite. Dois animais (20%) morreram cerca de 48 horas depois da indução da peritonite, mas ainda fizeram uso do meropenem na dose planejada 4 horas antes. Um animal (10%) morreu dentro das 36 horas pós indução, falecendo 12 horas após a administração do meropenem. Um animal morreu 24 horas depois da administração do meropenem (48 horas depois da indução da peritonite). Apenas dois ratos sobreviveram pelos 45 dias de seguimento previstos no protocolo e fizeram uso de três doses do meropenem nas 24, 48 e 72 horas após indução da peritonite quando foram então eutanasiados e submetidos ao inventário das cavidades abdominal e torácica.

As hemoculturas foram realizadas apenas nos ratos que sobreviveram até o final do seguimento de 45 dias e se revelaram negativas na quase totalidade dos ratos (quadro 2).

Quadro 2 – Resultados das hemoculturas

Grupo I		Grupo II		Grupo III	
Rato 1	<i>Escherichia coli</i>	Rato 1	Negativo	Rato 1	Óbito
Rato 2	Negativo	Rato 2	Óbito	Rato 2	Óbito
Rato 3	Negativo	Rato 3	Negativo	Rato 3	Óbito
Rato 4	Negativo	Rato 4	Negativo	Rato 4	Óbito
Rato 5	Negativo	Rato 5	Negativo	Rato 5	Óbito
Rato 6	Óbito	Rato 6	Negativo	Rato 6	Negativo
Rato 7	Negativo	Rato 7	Negativo	Rato 7	Óbito
Rato 8	Negativo	Rato 8	Negativo	Rato 8	Negativo
Rato 9	Negativo	Rato 9	Negativo	Rato 9	Óbito
Rato 10	Negativo	Rato 10	Negativo	Rato 10	Óbito

Os achados da necrópsia dos 8 ratos que morreram nas primeiras 48 horas após indução da peritonite revelaram um líquido turvo dentro da cavidade abdominal e pulmões hemorrágicos com manchas alaranjadas em sua superfície. Figuras 11 e 12.



Figura 11 – Superfície do pulmão esquerdo mostrando manchas hemorrágicas alaranjadas.



Figura 12 – Visão aproximada do pulmão direito mostrando o órgão hemorrágico e com manchas alaranjadas.

O inventário das cavidades abdominal e torácica, após o seguimento de 45 dias, mostrou: em um rato um grande abscesso em resolução (4 cm x 3 cm) localizado na área retroperitoneal posterior nas imediações do quadrante inferior esquerdo do abdome com abscessos nas superfícies dos pulmões. No outro animal foram observados dois pequenos abscessos em diferentes segmentos do intestino delgado e também abscessos nas superfícies de ambos os pulmões. Ambos animais ganharam peso e apresentaram comportamento normal durante o seguimento. Figuras 13 e 14.



Figura 13A - Grande abscesso retroperitoneal no quadrante abdominal inferior esquerdo.



Figura 13B - Depois de abrir o abscesso houve drenagem de massa purulenta necrótica.



Figura 14 - Vários abscessos observados na superfície dos pulmões.



DISCUSSÃO

Sepse é um grave problema no mundo inteiro e sua incidência e mortalidade eleva-se dramaticamente com o aumento da idade. Pacientes idosos morrem mais precocemente durante a hospitalização e aqueles que sobrevivem necessitam de cuidados adicionais para readquirir seu *status* funcional prévio^{1,23,25,139}. Anormalidades na resposta imune, alterações na produção de citocinas bem como na coagulação caracterizam os aspectos fisiopatológicos únicos que respondem pela evolução desfavorável da sepse nesse grupo etário^{67,69,71,73,140}.

Quando comparados a animais jovens, percebe-se que os animais mais velhos apresentam respostas inflamatórias aumentadas. A concentração de várias citocinas na circulação como TNF- α , IL-1, IL-6 e leptina, usualmente aumentadas durante a sepse, estão mais elevadas em animais mais velhos quando expostos à mesma agressão de animais jovens¹⁴¹⁻¹⁴³.

Apesar da nítida influência da idade na evolução da sepse, a maior parte da pesquisa experimental é conduzida com animais jovens. Enquanto a maioria dos pacientes com sepse apresenta mais de 50 anos de idade, os animais utilizados nas pesquisas têm menos de 3 meses o que é comparável a jovens com até 20 anos. Essa incompatibilidade compromete a translação dos achados experimentais para conceitos que possam ser aplicados em humanos^{98,144,145}.

Em seres humanos, dentre os fatores que influenciam a mortalidade por peritonite bacteriana secundária em idosos, há um predomínio daqueles relacionados sobre o tipo e a fonte de infecção com população de alto risco identificados por idade acima de 60 anos^{68,73,146,147}. Quando comparados a pacientes mais jovens, os pacientes idosos apresentam mais comorbidades, reações fisiológicas tardias e comprometidas resultando em desfechos desfavoráveis. Além disso, a apresentação clínica frequentemente atípica e maior retardo no diagnóstico e conduta resultam em pior prognóstico. Mesmo em emergências cirúrgicas mais simples, como a apendicite frequentemente vista em adultos jovens, nos quais os resultados são geralmente bons, no idoso a doença é muito mais grave e requer um diagnóstico e tratamento precoces e, ainda assim, está associada a uma mortalidade de cerca de 3% e complicações pós-operatórias em torno de 20%^{148,149}.

Os resultados do presente estudo demonstram que os ratos do grupo III (idosos) apresentaram uma evolução clínica demasiadamente prejudicada frente à peritonite fecal

autógena na dosagem de 6 ml/kg. Para manter dois ratos vivos foi preciso quebrar o protocolo inicial injetando três doses do meropenem endovenoso (40mg/kg) após a indução da peritonite nos dias 2 a 4. Embora este resultado pudesse ser esperado, faz-se necessário avaliar o modelo utilizado no que diz respeito a ratos idosos. A dose habitual para inoculação de fezes autógenas a 10% é de 5 mL/kg, mas a maioria dos estudos experimentais sobre peritonite fecal omite a idade dos animais e, quando descrita, revela grupos de animais jovens o que compromete a comparação com os achados em ratos idosos¹⁵⁰⁻¹⁵⁹.

No presente estudo foi seguido um protocolo anterior¹¹³, em que foi produzida uma peritonite grave e sepse, mas os ratos eram jovens (cerca de 12 meses de idade). Uma das limitações do presente estudo foi não prever que os 6mL/kg da suspensão fecal autógena a 10% para a promoção da peritonite fecal seria um insulto infeccioso grave demais para o grupo idoso (18 meses), não permitindo avaliar adequadamente a resposta ao meropenem, nem a comparação com os grupo de ratos jovens. Pode-se especular que neste grupo a indução da peritonite poderia ter sido feita numa carga menor de 4 ou 5 ml/kg de rato e com um protocolo diferenciado que previsse a administração mais precoce da antibioticoterapia.

Os ratos de laboratório vivem cerca de 3 anos em média enquanto que a expectativa de vida dos humanos é cerca de 80 anos com diferenças entre os diferentes países e condições socioeconômicas podendo-se estabelecer uma relação de 1 dia (rato) = 26,7 dias (homem)^{160,161}. Como os ratos têm uma infância breve e acelerada, quando comparados aos humanos, pode-se estimar que a idade do primeiro grupo (6 meses) corresponderia a humanos com 18 anos, o grupo II (12 meses) a 30 anos e o grupo III (18 meses) a adultos de 45 anos de idade¹⁶². No entanto, ratos não são formas em miniatura de humanos. Existem importantes diferenças na anatomia, fisiologia e de desenvolvimento que devem ser levados em consideração quando se analisam resultados de uma pesquisa onde a idade é um fator crucial. Notavelmente, observou-se que o comportamento dos ratos no grupo III foi de idosos com a resposta imunitária comprometida (imunossenescência) o que talvez se explique pela presença de comorbidades neste grupo que apresentou obesidade bem mais pronunciada que os dois primeiros grupos.

Não existe um modelo ideal para o desenvolvimento de sepse. As síndromes humanas são intrinsecamente complexas, pois sua evolução reflete não apenas as muitas nuances do insulto inicial (local do insulto, microbiologia e tempo para a intervenção, por exemplo), mas também a resposta à correção do transtorno inicial. O objetivo da pesquisa translacional é transformar o conhecimento adquirido em modelos experimentais em novos tratamentos para a doença no homem. Em geral os modelos falham em reproduzir a complexidade humana sobretudo pela falta de padronização dos modelos estudados. Para estudos experimentais que

mimetizam quadros sépticos graves é crucial a descrição rotineira da idade cronológica dos animais para que se possa comparar adequadamente os resultados dos diversos trabalhos.



CONCLUSÃO

O tratamento da peritonite fecal autógena grave com dose única de meropenem endovenoso (40mg/kg) alcançou bons resultados em ratos com seis e doze meses de idade, mesmo considerando abscessos residuais em cavidades do abdome e tórax. A grande maioria dos ratos idosos, no entanto, não conseguiu superar o quadro infeccioso inicial, provando que o envelhecimento é um fator de risco muito importante que acarreta grande prejuízo à resposta imunológica. Assim, a sepse se mantém como um desafio, especialmente em idosos, e a pesquisa experimental atua como peça-chave na busca de resultados.



REFERÊNCIAS

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001 Jul;29:1303-1310. PMID: 11445675.
2. Artigas A, Sicignano A, Palazzo M, Moreno S, Boulmé R, Lepage E, Le Gall JR. Epidemiology of sepsis and infection in ICU patients from an international multicentre cohort study. *Intensive Care Med* 2002 Feb;28(4):108-121. PMID:11907653. doi :10.1007/s00134-0.
3. Franceschi C, Bonafe M, Valensin S, Olivieri F, De Luca M, Ottaviani E, De Benedictis G. Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. *Ann NY Acad Sci* 2000 Jun;908:244-254.
4. Giunta G. Exploring the complex relations between inflammation and aging (inflamm-aging): anti-inflamm-aging remodelling of inflamm-aging, from robustness to frailty. *Inflamm Res* 2008 Dec;57:558-563. PMID: 19109735. doi: 10.1007/s00011-008-7243-2.
5. Gonnert FA, Recknagel P, Seidel M, Jbeily N, Dahlke K, Bockmeyer CL, Winning J, Lösche W, Claus RA, Bauer M. Characteristics of clinical sepsis reflected in a reliable and reproducible rodent sepsis model. *J Surg Res* 2011 Sep;170(1):123-134. PMID: 217371.
6. Solomkin JS, Mazuski JE, Baron EJ, et al. Guidelines for the selection of antiinfective agents for intra-abdominal infections. *Clin Infect Dis* 2003 Oct;37:997–1005. PMID: 14523762. doi: 10.1086/378702.
7. Mazuski JE, Solomkin JS. Intra-abdominal infections. *Surg Clin North Am* 2009 Apr;89(2):421-437, PMID: 19281892. doi:10.1016/j.suc.2008.12.001.
8. Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, Ward PA. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. *Nat Protoc* 2009 Dec;4:31–36. PMID: 19131954. doi:10.1038/nprot.2008.214.
9. Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock* 2000 Feb;13:110–116. PMID: 10670840.

10. Weinstein WM, Onderdonk AB, Bartlett JG, Gorbach SL: Experimental intraabdominal abscesses in rats: development of an experimental model. *Infect Immun* 1974 Dec;10:1250–1255. PMID: 4611922.
11. Freise H. Animal models of sepsis. *J Invest Surg* 2001 Jul;14:195-212. PMID: 11680530.
12. Garrido AG, Figueiredo LFP, Silva MR. Experimental models of sepsis and septic shock: an overview. *Acta Cir Bras.* 2004 Mar;19:82-88. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502004000200001>.
13. Mazuski JE, Sawyer RG, Nathens AB, et al. The Surgical Infection Society guidelines on antimicrobial therapy for intra-abdominal infections: an executive summary. *Surg Infect (Larchmt)* 2002 Jul;3:161–173. PMID: 12542923. doi:10.1089/109629602761624180.
14. Goldstein EJC. Intra-abdominal anaerobic infections: bacteriology and therapeutic potential of newer antimicrobial carbapenem, fluoroquinolone, and desfluoroquinolone therapeutic agents. *Clin Infect Dis* 2002 Sep;35(Suppl 1):106–111. PMID: 12173118.
15. Teppler H, McCarroll K, Gesser RM, et al. Surgical infections with *Enterococcus*: outcome in patients treated with ertapenem versus piperacillin-tazobactam. *Surg Infect (Larchmt)* 2002 Jul;3:337–349. PMID: 12697080. doi:10.1089/109629602762539553.
16. Majno G. The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). *J Infect Dis* 1991 May;163:937-945. PMID: 2019770. doi: 10.1093/infdis/163.5.937.
17. Funk DJ, Parrillo JE, Kumar A. Sepsis and septic shock: a history. *Crit Care Clin* 2009 Jan;25:83-101. viii. PMID: 19268796. doi: 10.1016/j.ccc.2008.12.003.
18. Cerra FB. The systemic septic response: multiple systems organ failure. *Crit Care Clin* 1985 Nov;1:591-607. PMID:3916795.
19. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992 Nov;101:1644-1655. PMID: 1303622. doi:10.1378/chest.101.6.1644.
20. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. *Crit Care Med.* 2003 Apr;31(4):1250-1256. PMID: 12682500. doi: 10.1097/01.CCM.0000050454.01978.3B
21. Silva E, Pedro Mde A, Sogayar AC, Mohovic T, Silva CL, Janiszewski M, Cal RG, de Sousa EF, Abe TP, de Andrade J, de Matos JD, Rezende E, Assunção M, Avezum A, Rocha PC, de Matos GF, Bento AM, Corrêa AD, Vieira PC, Knobel E; Brazilian Sepsis

- Epidemiologica (BASES study). Crit Care. 2004 Aug;8(4):251-260. PMID: 15312226. doi:10.1186/cc2892.
22. Rangel-Frausto MS, Pittet D, Costigan M, Hwang T, Davis CS, Wenzel RP. The natural history of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS): a prospective study. JAMA 1995 Jan;273 :117-123. PMID: 7799491. doi:10.1001/jama.1995.03520260039030.
23. Martin GS, Mannino DM, Eaton S, Moss M. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med 2003 Apr; 348 (16):1546-1554. PMID: 12700374. doi: 10.1056/NEJMoa022139.
24. Hodgkin KE, Moss M. The epidemiology of sepsis. Curr Pharm Des 2008 Apr; 14 (19):1833-1839. PMID: 18691094. doi: 10.2174/138161208784980590.
25. Dombrovskiy VY, Martin AA, Sunderram J, Paz HL: Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: A trend analysis from 1993 to 2003. Crit Care Med 2007 May; 35 (5):1244–1250. PMID: 17414736. doi: 10.1097/01.CCM.00.
26. Lagu T, Rothberg MB, Shieh MS, Pekow PS, Steingrub JS, Lindenauer PK. Hospitalizations, costs, and outcomes of severe sepsis in the United States 2003 to 2007. Crit Care Med 2012 Mar;40:754-756. PMID: 21963582. doi: 10.1097/CCM.0b013e318232db65.
27. Ranieri VM, Thompson BT, Barie PS, et al. Drotrecogin alfa (activated) in adults with septic shock. N Engl J Med 2012 May;366:2055-2064. PMID: 22616830. doi: 10.1056/NEJMoa1202290.
28. Vincent JL, Rello J, Marshall J, et al. International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. JAMA 2009 Dec;302:2323-2329. PMID: 19952319. doi: 10.1001/jama.2009.1754.
29. Opal SM, Garber GE, LaRosa SP, et al. Systemic host responses in severe sepsis analyzed by causative microorganism and treatment effects of drotrecogin alfa (activated). Clin Infect Dis 2003 Jul;37:50-58. PMID: 12830408. doi: 10.1086/375593.
30. Remick DG. Pathophysiology of sepsis. Am J Pathol 2007 May;170(5):1435–1444. PMID: 17456750. doi: 10.2353/ajpath.2007.060872.
31. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. N Engl J Med 2003 Jan;348(2):138–150. PMID: 12519925. doi: 10.1056/NEJMra021333.

32. Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis. *Crit Care Med* 2006 Jan;34(1):15-21. PMID: 16374151. doi: 10.1097/01.CCM.0000194535.82812.BA.
33. Rittirsch D, Flierl MA, Ward PA. Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 2008 Oct;8(10):776–787. PMID: 18802444. doi: 10.1038/nri2402.
34. Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock* 2001 Aug;16(2):83–96. PMID: 11508871.
35. Hotchkiss RS, Opal S. Immunotherapy for sepsis—a new approach against an ancient foe. *N Engl J Med* 2010 Jul;363(1):87–89.
36. Shui JW, Steinberg MW, Kronenberg M. Regulation of inflammation, autoimmunity, and infection immunity by HVEM-BTLA signaling. *J Leukoc Biol* 2011 Apr;89(4):517–523. PMID: 21106644 . doi: 10.1189/jlb.0910528.
37. Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001 Nov;1(2):135-145. PMID: 11905821. doi:10.1038/35100529.
38. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010 Mar;140:805-820. PMID: 20303872. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022.
39. Bone RC, Grodzin CJ, Balk RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest* 1997 Jul;112:235-243. PMID: 9228382. doi:10.1378/chest.112.1.235.
40. Carroll MV, Sim RB. Complement in health and disease. *Adv Drug Deliv Rev* 2011 Sep;63(12):965-975. PMID: 21704094. doi: 10.1016/j.addr.2011.06.005.
41. Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* 2000 Jul;343(1):37-49. PMID: 10882768. doi: 10.1056/NEJM200007063430107.
42. Siqueira-Batista R, Gomes AP, Calixto-Lima L, Vitorino RR, Perez MCA, Mendonça EG, Oliveira MGA, Geller M – Sepsis: atualidades e perspectivas. *Rev Bras Ter Intensiva* 2011 Apr;23(2):207-216. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-507X2011000200014>.
43. van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. *Lancet Infect Dis* 2008 Jan;8:32-43. PMID: 18063412. doi:10.1016/S1473-3099(07)70265-7.
44. López-Aguirre Y, Páramo JA. Endothelial cell and hemostatic activation in relation to cytokines in patients with sepsis. *Thromb Res* 1999 Apr;94(2):95-101. PMID: 10230894. [http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848\(98\)00200-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0049-3848(98)00200-X).
45. Vincent JL, Beumier M. Diagnostic and prognostic markers in sepsis. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2013 Mar;11(3):265-275. PMID: 23458767. doi: 10.1586/eri.13.9.
46. Hubacek JA, Stüber F, Fröhlich D, Book M, Wetegrove S, Ritter M, et al. Gene variants of the bactericidal/permeability increasing protein and lipopolysaccharide binding

- protein in sepsis patients: gender-specific genetic predisposition to sepsis. *Crit Care Med* 2001 Mar;29(3):557-561. PMID: 11373419.
47. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002 Dec;420(6917):885-891. PMID: 12490963. doi:10.1038/nature01326.
 48. Alves-Filho JC, Spiller F, Cunha FQ. Neutrophil paralysis in sepsis. *Shock* 2010 Sep;34 (Suppl 1):15-21. PMID: 20714263. doi: 10.1097/SHK.0b013e3181e7e61b.
 49. Bozza FA, Salluh JJ, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care* 2007 Apr;11(2):R49. PMID: 17448250. doi: 10.1186/cc5783.
 50. Mayr FB, Yende S, Linde-Zwirble WT, Peck-Palmer OM, Barnato AE, Weissfeld LA, Angus DC. Infection Rate and Acute Organ Dysfunction Risk as Explanations for Racial Differences in Severe Sepsis. *JAMA* 2010 Jun; 303(24):2495-2503. PMID: 20571016. doi: 10.1001/jam.
 51. Girard TD, Ely EW, Bacteremia and Sepsis in Older Adults. *Clin Geriatr Med* 2007 Aug;23(3):633-647. PMID: 17631238. doi:10.1016/j.cger.2007.05.003.
 52. Bateman BT, Schmidt U, Berman MF, Bittner EA. Temporal Trends in the Epidemiology of Severe Postoperative Sepsis after Elective Surgery. *Anesthesiology* 2010 Apr;112(4):917-925. PMID: 20357565. doi: 10.1097/ALN.0b013e3181cea3d0.
 53. Kirkwood TBL, Cremer T. Cytoogerontology since 1881: a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress. *Hum Genet.* 1982 Apr;60:101-121. PMID: 7042533.
 54. Williams GC. Pleiotropy, natural selection and the evolution of senescence. *Evolution* 1957 Dec;11:398-411.
 55. Martin GM, Austad SN, Johnson TE. Genetic analysis of aging: role of oxidative damage and environmental stresses. *Nature Genet* 1996 May;13:25-34. PMID: 8673100. doi:10.1038/ng0596-25.
 56. Kirkwood TBL. Evolution of ageing. *Nature* 1977 Nov;270:301-304. PMID: 593350. doi:10.1038/270301a0.
 57. Kirkwood TBL, Austad SN. Why do we age? *Nature* 2000 Nov;408:233-238. PMID: 11089980. doi:10.1038/35041682.
 58. Cui H, Kong Y, Zhang H. Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct* 2012 Aug;2012:1-13. PMID: 21977319. doi: 10.1155/2012/646354.

59. Shaw AC, Panda A, Joshi SR, Qian F, Allore HG, Montgomery RR. Dysregulation of human toll-like receptor function in aging. *Ageing Res Rev* 2011 Jul;10(3):346-353. PMID: 21074638. doi: 10.1016/j.arr.2010.10.007.
60. Hazeldine J, Arlt W, Lord JM. Dehydroepiandrosterone as a regulator of immune cell function. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2010 May;120(2-3):127-136. PMID: 20060904. doi: 10.1016/j.jsbmb.2009.12.016.
61. Larbi A, Franceschi C, Mazzatti D, Solana R, Wikby A, Pawelec G. Aging of the immune system as a prognostic factor for human longevity. *Physiology (Bethesda)* 2008 Apr; 23: 64-74. PMID: 18400689. doi: 10.1152/physiol.00040.2007.
62. Kovacs EJ, Palmer JL, Fortin CF, Fulop Jr T, Goldstein DR, Linton PJ. Aging and innate immunity in the mouse: impact of intrinsic and extrinsic factors. *Trends Immunol* 2009 Jul; 30: 319-324. PMID: 19541536. doi: 10.1016/j.it.2009.03.012.
63. Swindell WR. Genes and gene expression modules associated with caloric restriction and aging in the laboratory mouse. *BMC Genomics* 2009 Dec;10:585. PMID: 19968875. doi: 10.1186/1471-2164-10-585.
64. Krabbe KS, Pedersen M, Bruunsgaard H. Inflammatory mediators in the elderly. *Exp Gerontol* 2004 Dec;39:687-699. PMID: 15130663. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exger.2004.01.009>.
65. Helenius M, Hänninen M, Lehtinen SK, Salminen A. Changes associated with aging and replicative senescence in the regulation of transcription factor nuclear factor- κ B. *Biochem J* 1996 Sep; 318:603-608. PMID: 8809053.
66. Salminen A, Huuskonen J, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T. Activation of innate immunity system during aging: NF- κ B signaling is the culprit of inflamm-aging. *Ageing Res Rev* 2008 Apr;7:83-105. PMID: 17964225.
67. Franceschi C, Capri M, Monti D, Giunta S, Olivieri F, Sevini F, Panourgia MP, Invidia L, Celani L, Scurti M, Cevenini E, Castellani GC, Salvioli S. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. *Mechanisms of Ageing and Development* 2007 Jan;128(1):92-105. PMID: 17116321.
68. Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence of ageing. *J G Pathol* 2007 Apr;120(4):435-446. PMID: 17313487. doi: 10.1111/j.1365-2567.2007.02555.x.
69. Alonso-Fernández P, De la Fuente M. Role of the immune system in aging and longevity. *Curr Aging Sci* 2011 Jul;4(2):78-100. PMID: 21235494. doi: 10.2174/1874609811104020078.

70. Agarwal S, Busse PJ. Innate and adaptive immunosenescence. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010 Mar;104(3):183-190. PMID: 20377107. doi: 10.1016/j.anai.2009.11.009.
71. Schneider EL. Infectious diseases in the elderly. *Ann Intern Med* 1983 Mar;98:395-400. PMID: 6830081. doi:10.7326/0003-4819-98-3-395.
72. Oaks WW, Cohen HE. Endotoxin shock in the geriatric patient. *Geriatrics* 1967 Mar;22:120-130. PMID: 5335496.
73. Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing. *J G Pathol* 2007 Jan; 211(2):144-156. PMID: 17200946. doi: 10.1002/path.2104.
74. Shaw AC, Joshi S, Greenwood H, Panda A, Lord JM. Aging of the innate immune system. *Cur Opin Immunol* 2010 Aug;22:507-513. PMID: 20667703. doi: 10.1016/j.coi.2010.05.003.
75. Miller RA. The aging immune system: primer and prospectus. *Science* 1996 Jul;273:70-74. PMID: 8658199. doi:10.1126/science.273.5271.70.
76. Biron CA. More things in heaven and earth: defining innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 2010 Dec;11:1080-1082. PMID: 21079631. doi: 10.1038/ni1210-1080.
77. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B. The aging of the immune system. *Transpl Int* 2009 Nov;22:1041-1050. PMID: 19624493. doi: 10.1111/j.1432-2277.2009.00927.x.
78. Ribizzi G, Fiordoro S, Barocci S, Ferrari E, Megna M. Cytokine polymorphisms and Alzheimer disease: possible associations. *Neurol Sci* 2010 Jun;31(3):321-325. PMID: 20213229. doi: 10.1007/s10072-010-0221-9.
79. Effros RB. Telomere/telomerase dynamics within the human immune system: effect of chronic infection and stress. *Exp Gerontol* 2011 Feb;46:135-140. PMID: 20833238. doi: 10.1016/j.exger.2010.08.027.
80. Ostan R, Bucci L, Capri M, Salvioli S, Scurti M, Pini E, Monti D, Franceschi C. Immunosenescence and immunogenetics of human longevity. *Neuroimmunomodulation* 2008 Nov;15:224-240. PMID: 19047800. doi: 10.1159/000156466.
81. Weng NP, Akbar AN, Goronzy J. CD28(-) T cells: their role in the age-associated decline of immune function. *Trends Immunol* 2009 Jul;30:306-312. PMID: 19540809. doi: 10.1016/j.it.2009.03.013.
82. Maue AC, Yager EJ, Swain SL, Woodland DL, Blackman MA, Haynes L. T-cell immunosenescence: lessons learned from mouse models of aging. *Trends Immunol* 2009 Jul;30(7):301-305. PMID: 19541537. doi: 10.1016/j.it.2009.04.007.

83. Papassotiropoulos A, Bagli M, Jessen F, Bayer TA, Maier W, Rao ML, et al. A genetic variation of the inflammatory cytokine interleukin-6 delays the initial onset and reduces the risk for sporadic Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1999 May;45:666-668. PMID: 103198.
84. Mocchegiani E, Giacconi R, Cipriano C, Malavolta M. NK and NKT cells in aging and longevity: role of zinc and metallothioneins. *J Clin Immunol* 2009 Jul;29:416-425. PMID: 19408107. doi: 10.1007/s10875-009-9298-4.
85. Naylor K, Li G, Vallejo AN, Lee WW, Koetz K, Bryl E, Witkowski J, Fulbright J, Weyand CM, Goronzy JJ. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol* 2005 Jun;174(11):7446-7452. PMID: 15905594.
86. Caruso C, Buffa S, Candore G, Colonna-Romano G, Dunn-Walters D, Kipling D, Pawelec G. Mechanisms of immunosenescence. *Immun Ageing* 2009 Jul;6:10:1-4. PMID: 19624841. doi: 10.1186/1742-4933-6-10.
87. Ongrádi J, Kövesdi V. Factors that may impact on immunosenescence:an appraisal. *Immun Ageing* 2010 Jun;7:7. PMID: 20546588. doi: 10.1186/1742-4933-7-7.
88. Aydar Y, Balogh P, Tew JG, Szakal AK. Age-related depression of FDC accessory functions and CD21 ligand mediated repair of co-stimulation. *Eur J Immunol* 2002 Oct;32:2817-2826. PMID: 12355434. doi: 10.1002/1521-4141(2002010)32:10.
89. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock - a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980 Aug;29:189-201. PMID: 6997619.
90. Fink MP, Heard SO. Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 1990 Aug;49:186-196. PMID: 2199735.
91. Johnston TD, Hampton WW, Fry DE. Septic hemodynamics produced by infusion of endotoxin. *Curr Surg* 1989 Mar;46:101-103. PMID: 2736959.
92. Parker SJ, Watkins PE. Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg* 2001 Jan;88:22-30. PMID: 11136305. doi: 10.1046/j.1365-2168.2001.01632.x.
93. Piper RD, Cook DJ, Bone RC, Sibbald WJ. Introducing critical appraisal to studies of animal models investigating novel therapies in sepsis. *Crit Care Med* 1996 Dec;24:2059-2070. PMID: 8968277.
94. Opal SM, Cohen J. Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from gram-negative bacterial sepsis? *Crit Care Med* 1999 Aug;27:1608-1616. PMID: 10470773.

95. Silverstein R, Wood JG, Xue Q, Norimatsu M, Horn D, Morrison DC. Differential host inflammatory responses to viable versus antibiotic-killed bacteria in experimental microbial sepsis. *Infect Immun* 2000 Apr;68:2301-2308. PMID: 10722633.
96. Hollenberg SM, Dumasius A, Eassington C, Colilla SA, Neumann A, Parrillo JE. Characterization of a hyperdynamic murine model of resuscitated sepsis using echocardiography. *Am J Respir Crit Care Med* 2001 Sep;164:981-985. PMID: 11549551. doi: 10.1164/ajrccm.164.5.
97. Lepper PM, Held TK, Schneider EM, Bolke E, Gerlach H, Trautmann M. Clinical implications of antibiotic-induced endotoxin release in septic shock. *Intensive Care Med* 2002 Jul;28:824-833. PMID: 12122518. doi: 10.1007/s00134-002-1330-6.
98. Rittirsch D, Hoesel LM, Ward PA. The disconnect between animal models of sepsis and human sepsis. *J Leukoc Biol* 2007 Jan. 81:137–143. PMID: 17020929. doi: 10.1189/jlb.0806542.
99. Cohen J. Adjunctive therapy in sepsis: a critical analysis of the clinical trial program. *Br Med Bull* 1999 Jan. 55:212–225. PMID: 10695088.
100. Giantomasso DD, May CN, Bellomo R. Vital blood flow during hyperdynamic sepsis. *Chest* 2003 Sep;124:1053-9. PMID: 12970037. doi:10.1378/chest.124.3.1053.
101. Haberstroh J, Breuer H, Lucke I, Massarrat K, Fruh R, Mand U, Hagedorn P, Brunnberg L, von Specht BU. Effect of a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor on hemodynamic and response in a porcine model of *Pseudomonas* sepsis. *Shock* 1995 Sep;4(3):216-224.
102. Perdue PW, Perdue PW, Kazarian KK, Nevola J, Law WR, Williams T. The use of local and systemic antibiotics in rat fecal peritonitis. *J Surg Res* 1994 Sep; 57(3):360-365. PMID: 8072283.
103. Araujo ID, Grossi GCX, Diniz SOF, Nunes TA, Braga EÂ, Cardoso VN. Effects of the povidone-iodine (PVPI) in treatment of bacterial peritonitis induced in rats. *Acta Cir Bras* 2010 Aug; 25(4):322-327. doi.org/10.1590/S0004-28032005000200006.
104. Poli-de-Figueiredo LF, Garrido AG, Nakagawa N, Sannomiya P. Experimental models of sepsis and their clinical relevance. *Shock* 2008 oct;30(Suppl 1):53-59. PMID: 18704008. doi: 10.1097/SHK.0b013e318181a343.
105. Hubbard WJ, et al. Cecal ligation and puncture. *Shock* 2005 Dec;24(Suppl 1):52–57. PMID: 16374373.
106. Kreimer F, Aguiar JLA, Castro CMMB, Lacerda CM, Reis T, Lisboa Júnior F. Therapeutical and inflammatory response in rats with secondary peritonitis and topical

- use of ampicilin/sulbactam. *Acta Cir Bras* 2005;20(Suppl 1):63-71. <http://dx.doi.org/10.1590/S010>.
107. Hyde SR, Stith RD, McCallum RE. Mortality and bacteriology of sepsis following cecal ligation and puncture in aged mice. *Infect Immun* 1990 Mar; 58(3):619-624. PMID: 2307515.
108. Dejager L, Pinheiro I, Dejonckheere E, Libert C. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? *Trends Microbiol* 2011 Apr;19(4):198-208. PMID: 21296575. doi: 10.1016/j.tim.2011.01.001.
109. Deitch EA. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock* 2005;24(Suppl 1):19–23. PMID:16374368.
110. Bartlett JG, Onderdonk AB, Louie T, Kasper DL, Gorbach SL: Lessons learned from an animal model of intra-abdominal sepsis. *Arch Surg* 1978 Jul;113:853–857. PMID: 354591.
111. Nichols RL, Smith JW, Balthazar ER: Peritonitis and intra-abdominal abscess: an experimental model for the evaluation of human disease. *J Surg Res* 1978 Aug; 25:129–134. PMID: 682623.
112. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH: Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 1980 Aug. 29:189–201.
113. Cavalcanti MMCS, Gadelha DB, Oliveira TKB, Brandt CT. Severe autogenously fecal peritonitis in Wistar rats with permanent bilateral carotid occlusion. Response to intra peritoneal moxifloxacin combined with dexamethasone. *Acta Cir Bras* 2014 Feb; 29(2):76-81.
114. Schweinburg FB, Frank HA, Frank ED, et al. Transmural migration of intestinal bacteria during peritoneal irrigation in uremic dogs. *Proc Soc Exp Biol Med* 1949 May; 71:150–153. PMID:18151508.
115. Deitch EA, Maejima K, Berg R. Effect of oral antibiotics and bacterial overgrowth on the translocation of the GI tract microflora in burned rats. *J Trauma*. 1985 May; 25:385–392. PMID:3889357.
116. Blot S, De Waele JJ. Critical issues in the clinical management of complicated intra-abdominal infections. *Drugs* 2005 Jul;65:1611–1620. PMID: 16060697. doi: 10.2165/00003495-200565120-00002.
117. Wittmann DH, Schein M, Condon RE. Management of secondary peritonitis. *Ann Surg* 1996 Jul;224(1):10-18. PMID: 8678610.

118. Buijk SE, Bruining HA. Future directions in the management of tertiary peritonitis. *Intensive Care Med* 2002 Aug;28:1024–1029. PMID: 12185420. doi: 10.1007/s00134-002-1383-6.
119. Nathens AB, Rotstein OD, Marshall JC. Tertiary peritonitis: clinical features of a complex nosocomial infection. *World J Surg* 1998 Feb;22:158–163. PMID: 9451931.
120. Emmi V, Sganga G. Diagnosis of intra-abdominal infections: clinical findings and imaging. *Infez Med* 2008 Feb;16 (Suppl 1):19-30. PMID: 18382148.
121. Emmi V, Sganga G. Clinical diagnosis of intra-abdominal infections. *J Chemother*. 2009 Jul;21(Suppl 1):12-18. PMID: 19622446. doi: <http://dx.doi.org/10.1179/joc.2009.21.Supplement-1.12>.
122. Mackowiak PA. The normal microbial flora. *N Engl J Med* 1982 Jul;307:83–93. PMID: 6806656. doi: 10.1056/NEJM198207083070203.
123. Berg RD. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends Microbiol* 1996 Nov;4:430–435. PMID: 8950812. [http://dx.doi.org/10.1016/0966-842X\(96\)10057-3](http://dx.doi.org/10.1016/0966-842X(96)10057-3).
124. Marshall JC: Intra-abdominal infections. *Microbes Infect* 2004 Sep;6(11):1015-1025. PMID: 15345234.
125. Brook I. Microbiology of polymicrobial abscesses and implications for therapy. *J Antimicrob Chemother* 2002 Dec;50:805–810. PMID: 12460997. doi: 10.1093/jac/dkg009.
126. Goldstein EJC, Snyderman DR. Intra-abdominal infections: review of the bacteriology, antimicrobial susceptibility and the role of ertapenem in their therapy. *J Antimicrob Chemother* 2004 Jun;53:29–36. PMID: 15150181. doi: 10.1093/jac/dkh201.
127. dos Santos SG, de Carvalho MA, Serufo JC, Pinto-Silva RA, Albuquerque W, Rosa RV, Pires Ade F, Hahn RC, Hamdan JS, Nicoli JR, Farias Lde M. Antimicrobial susceptibility of microorganisms recovered from intraabdominal infections at Belo Horizonte, Brazil. *Am J Infect Control* 2004. Nov;32(7):414-416. PMID:15525917 doi:10.1016/j.ajic.2004.02.005.
128. Roehrborn A, Thomas L, Potreck O, et al. The microbiology of postoperative peritonitis. *Clin Infect Dis* 2003 Nov;33:1513–1519. PMID: 11568851. doi: 10.1086/323333.
129. Calandra T, Bille J, Schneider R, et al. Clinical significance of *Candida* isolated from peritoneum in surgical patients. *Lancet* 1989 Dec;2(8677):1437–1440. PMID: 2574368. doi:10.1016/S0140-6736(89)92043-6.

130. Wong PF, Gilliam AD, Kumar S, et al. Antibiotic regimens for secondary peritonitis of gastrointestinal origin in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2005 Apr;2: CD004539. PMID: 15846719. doi: 10.1002/14651858.CD004539.pub2.
131. Malangoni MA, Song J, Herrington J, et al. Randomized controlled trial of moxifloxacin compared with piperacillin-tazobactam and amoxicillin-clavulanate for the treatment of complicated intra-abdominal infections. *Ann Surg* 2006 Aug; 244:204–11. PMID: 16858182.
132. Lucasti C, Abel Jasovich A, Umeh O, et al. Efficacy and tolerability of IV doripenem versus meropenem in adults with complicated intra-abdominal infection: a phase III, prospective, multicenter, randomized, double-blind, noninferiority study. *Clin Ther* 2008 May;30(5):868-83. PMID: 18555934. doi: 10.1016/j.clinthera.2008.04.019.
133. Mosdell DM, Morris DM, Voltura A, et al. Antibiotic treatment for surgical peritonitis. *Ann Surg* 1991 Nov;214:543–549. PMID: 1953104.
134. Kushwah A, Gandhe M, Patel P. Antibacterial resistance: an overview. *J Indian Med Assoc* 2013 Apr; 111(4):260-263. PMID: 24475559.
135. Andersson DI, Hughes D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? *Nat Rev Microbiol* 2010 Apr;8(4):260-271. PMID: 20208551. doi: 10.1038/nrmicro2319.
136. McLaughlin M, Advincula MR, Malczynski M, Qi C, Bolon M, Scheetz MH. Correlations of antibiotic use and carbapenem resistance in enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother* 2013 Oct;57(10):5131-5133. doi: 10.1128/AAC.00607-13.
137. van Duin D, Kaye KS, Neuner EA, Bonomo RA. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013 Feb;75(2):115-120. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.11.009.
138. Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Princípios éticos na experimentação animal. São Paulo: COBEA; 1991.
139. Iwashyna TJ, Cooke CR, Wunsch H, Kahn JM. The Population Burden of Long-term Survivorship after Severe Sepsis among Older Americans. *J Am Geriatr Soc* 2012 Jun; 60(6):1070-1077. PMID: 22642542. doi:10.1111/j.1532-5415.2012.03989.x.
140. De Gaudio AR, Rinaldi S, Chelazzi C, Borraci T. Pathophysiology of sepsis in the elderly: clinical impact and therapeutic considerations. *Curr Drug Targets* 2009 Jan;10: 60-70. PMID: 19149537. doi: 10.2174/138945009787122879.

141. Starr ME, Evers BM, Saito H. Age-associated increase in cytokine production during systemic inflammation: adipose tissue as a major source of IL-6. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2009 Jul;64(7):723-730. PMID: 19377014. doi: 10.1093/gerona/glp046.
142. Turnbull IR, Clark AT, Stromberg PE, Dixon DJ, Woolsey CA, Davis CG, Hotchkiss RS, Buchman TG, Coopersmith CM. Effects of aging on the immunopathologic response to sepsis. *Crit Care Med* 2009 Mar;37(3):1018-1023. PMID: 19237912. doi: 10.1097/CCM.0b013e31819.
143. Gomez CR, Goral J, Ramirez L, Kopf M, Kovacs EJ. Aberrant acute-phase response in aged interleukin-6 knockout mice. *Shock* 2006 Jun;25(6):581-585. PMID: 16721265.
144. Zanotti-Cavazzoni SL, Goldfarb RD. Animal models of sepsis. *Crit Care Clin* 2009 Oct;25:703-719. PMID: 19892248. doi: 10.1016/j.ccc.2009.08.005.
145. Esmon CT. Why do animal models (sometimes) fail to mimic human sepsis? *Crit Care Med* 2004 May;32 (Suppl 5):219-222. PMID: 15118521.
146. Omari AH, Muhammad R Khammash MR, Qasaime GR, Ahmad K Shammari AK, Yaseeb MKB, Hammori SK. Acute appendicitis in the elderly: risk factors for perforation. *World J Emerg Surg* 2014 Jan;9(1):6. PMID: 24428909. doi: 10.1186/1749-7922-9-6.
147. Gürleyik G, Gürleyik E. Age-related clinical features in older patients with acute appendicitis. *Eur J Emerg Med* 2003 Sep;10(3):200-203. PMID: 12972895.
148. Teixeira PG, Demetriades D. Appendicitis: changing perspectives. *Adv Surg* 2013 Sep;47:119-140. PMID: 24298848.
149. Ramakrishnaiah VP, Chandrakasan C, Dharanipragadha K, Sistla S, Krishnamachari S. Community acquired bacterial peritonitis in a tertiary hospital of South India: an audit with special reference to peritoneal fluid culture. *Trop Gastroenterol* 2012 Oct-Dec;33(4):275-281. PMID: 23923354.
150. Brocco MC, Paulo DN, Almeida CE, Carraretto AR, Cabral SA, Silveira AC, Gomez RS, Baptista JF. A study of interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) serum levels in rats subjected to fecal peritonitis and treated with intraperitoneal ropivacaine. *Acta Cir Bras* 2012 Jul;27(7):494-498. PMID: 22760836.
151. Rodríguez ZZ, Guanche D, Alvarez RG, Rosales FH, Alonso Y, Schulz S. Preconditioning with ozone/oxygen mixture induces reversion of some indicators of oxidative stress and prevents organic damage in rats with fecal peritonitis. *Inflamm Res* 2009 Jul;58(7):371-375. PMID: 19274439. doi: 10.1007/s00011-009-0001-2.

152. Camargo MG, Fagundes JJ, Leal RF, Ayrizono Mde L, Rossi DH, Oliveira Pde S, Chung WF, Lee HD, Coy CS. Influence of the peritoneal lavage with bupivacaine on the survival and resistance of colonic anastomoses performed under fecal peritonitis in rats. *Acta Cir Bras* 2013 Nov;28(11):783-787. PMID: 24316746. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502013001100007>.
153. Torres OJM, Macedo EL, Melo TCM, Costa JVG, Nunes PMS, Viana RMM, Dietz UA. Peritonite fecal em ratos: eficácia da lavagem da cavidade peritoneal com solução de cloreto de sódio a 0,9%. *Acta Cir Bras* 1999 Apr;14(2):65-68.
154. Carneiro BGM, Petroianu A, Rodrigues FHOC, Rocha RF. Estudo comparativo entre diversos tipos de tratamento para peritonite fecal em rato. *Rev Col Bras Cir* 2002 Jan-Feb;29(1):43-48. [doi.org/10.1590/S0100-69912002000100009](http://dx.doi.org/10.1590/S0100-69912002000100009).
155. Brocco MC, Paulo DN, Baptista JF, Ferrari TA, de Azevedo TC, da Silva AL. Effects of peritoneal lavage with lidocaine on survival of rats with fecal peritonitis. *Acta Cir Bras* 2008 Jan-Feb;23:42-47. PMID: 18278392.
156. Brocco MC, Gomez RS, Paulo DN, Almeida CE, Baptista JF. Histological features of peritoneal lavage with ropivacaine in rats with fecal peritonitis. *Acta Cir Bras* 2012 Feb;27(2):193-199. [doi.org/10.1590/S0102-86502012000200016](http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502012000200016).
157. Brocco MC, Paulo DN, Baptista JF, Carraretto AR, Ferrari TA, de Azevedo TC, da Silva AL. Effects of peritoneal lavage with bupivacaine on survival of mice with fecal peritonitis. *Rev Bras Anesthesiol* 2008 Sep-Oct;58:474-479. PMID: 19382406.
158. Alberti LR, Petroianu A. Evaluation of peritoneal reinfection after fecal peritonitis. *Acta Cir Bras* 2012 Sep;27(9):630-633. PMID: 22936088.
159. Petroianu A, Carvalho and Carneiro BGM, Rodrigues FHOC, Rocha RF. Avaliação da reinfeção peritoneal após peritonite fecal em ratos. *Rev Col Bras Cir* 2004 Mar-Apr;31(2):90-94.
160. Quinn R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? *Nutrition*. 2005 Jun;21(6):775-757. PMID: 15925305.
161. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med* 2013 Jun;4(6):624-630. PMID: 23930179.
162. Andreollo NA, Santos EF, Araújo MR, Lopes LR. Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq Bras Cir Dig* 2012 Jan-Mar;25(1):49-51. PMID: 22569979.



ANEXOS

ANEXO A - APROVAÇÃO DO CÔMITE DE ÉTICA EM PESQUISA



CENTRO DE ENSINO SUPERIOR E DESENVOLVIMENTO
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICA DE CAMPINA GRANDE
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CESED

PARECER
CEUA Nº: 11
CIAEP/CONCEA Nº: 01.0001.2012
PROTOCOLO Nº: 0022/03092012-1
APROVADO EM 03/09/2012

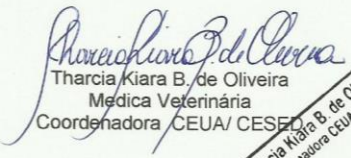
1. Pesquisador Responsável: Carlos Teixeira Brandt
2. Pesquisador: Guilherme Veras Mascena

Título do Projeto: Peritonite fecal autógena grave em ratos wistar. Resposta ao meropenem endovenoso

3. Objetivo: Investigar a morbi-mortalidade de ratos com peritonite fecal autógena tratado com meropenem em diferentes grupos etários.

4. Considerações: O projeto apresentado está bem descrito e coerente com as normas de utilização de animais. O protocolo de pesquisa está devidamente preenchido, com todos os itens solicitados entregue a CEUA/CESED.

5. Parecer Final: **APROVADO**


Tharcia Kiara B. de Oliveira
Médica Veterinária
Coordenadora CEUA/CESED


Av. Senador Argemiro de Figueiredo, 1901 - Itararé
CEP 53411-020 | Campina Grande - PB | (83) 2101.8800
www.cesed.br | facisa@cesed.br | fcm@cesed.br | esac@cesed.br

ANEXO B – TRABALHO PUBLICADO NA ACTA CIRÚRGICA BRASILEIRA

10 – ORIGINAL ARTICLE

EFFECTS OF DRUGS

Severe autogenously fecal peritonitis in aging Wistar rats. Response to Intravenous meropenem¹

Guilherme Veras Mascena^a, Maria Cecília Santos Cavalcanti Melo^a, Diego Nery Benevides Gadelha^{ab}, Thárcia Kiara Beserra Oliveira^{ac}, Carlos Teixeira Brandt^d

DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-8650201400150010>

^aFellow MSc degree, Postgraduate Program in Surgery, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco (UFPE). Assistant Professor, Department of Ophthalmology, Campina Grande Faculty of Medicine (FCM), Campina Grande-PB, Brazil. Acquisition and interpretation of data, manuscript writing.

^bFellow PhD degree, Postgraduate Program in Surgery, Health Sciences Center, UFPE. Assistant Professor, Department of Ophthalmology, FCM, Campina Grande-PB, Brazil. Acquisition and interpretation of data.

^cPhD, Postgraduate Program in Surgery, Health Sciences Center, UFPE, Recife-PE. Associate Professor, Department of Ophthalmology, FCM, Campina Grande-PB, Brazil. Manuscript writing, critical revision.

^dFellow Master degree in Agricultural Engineering, Federal Campina Grande University (UFCG), Campina Grande-PB, Brazil. Acquisition and interpretation of data.

^ePhD, Head Professor, Scientific Methodology and Pediatric Surgery, UFPE, Recife-PE. Scientific director, FCM, Campina Grande-PB, Brazil. Interpretation of data, English version, final revision.

ABSTRACT

PURPOSE: To evaluate the treatment outcome of severe peritonitis in rats with increasing age.

METHODS: Thirty Wistar rats stratified in three groups: group I – six month-old; group II – 12 month-old; and group III – 18 month-old, underwent autogenously fecal peritonitis (6 ml/kg rat), and were treated with intravenous meropenem. The survival animals were followed-up for 45 days. The variables were expressed by their mean and standard error of the mean (SEM). $p < 0.05$ was used for rejecting the null hypothesis. The study was approved by the Ethics Committee.

RESULTS: There was a significant increase in the mortality and morbidity in elderly rats. Of interest, even among young survival rats presenting with severe residual abscesses both in the abdomen and thorax cavities, they present an almost normal life.

CONCLUSIONS: The treatment of severe autogenously fecal peritonitis with intravenous meropenem reached reasonable results in rats with six and twelve months of age, even considering residual abscesses on abdomen and thorax cavities. However, the great majority (80%) of elderly rats could not overcome the initial severe infectious challenge, proving that ageing is a very important risk factor for impairing immune response. Thus, sepsis remains a challenging situation, especially in elderly.

Key words: Peritonitis. Carbapenems. Therapy. Rats.

Mascena GV *et al.*

Introduction

Advanced age, in human beings, has long been identified as a major risk factor for the development of postoperative septic complications following abdominal surgery¹. It is now becoming evident that the immune system undergoes age-associated alterations, which accumulate to produce a progressive deterioration in the ability to respond to infections that is associated with a higher mortality rate in the elderly². Thus, ageing is a complex phenomenon that negatively impacts the development of the immune system and its ability to function³.

Since 1987, there has been evidence that age-related difference in the pathophysiology of intraabdominal sepsis in rats. A more efficient bacterial clearance and a higher phagocytic activity in the peritoneal macrophages of the suckling rats could be one of aspect of the better immune response in these young animals⁴.

Several interventional approaches for treating intraabdominal sepsis in rat model describe the animals as adult male, Wistar-albino rats weighing from 250 to 320 g. However, chronological ages are not specified in most of the studies⁵⁻⁷. On the other hand, some studies used very young Wistar rats (age between two and three months, and weight between 200 and 250g)⁸.

The increased sensitivity of aged mice to invasive bacterial infection documented in one paper, according well with human epidemiological experience, demonstrated the appropriateness of the model for continued investigations of sepsis in the aged⁹.

Since 2009, carbapenems have been used in patients with secondary widespread peritonitis^{10,11}, from 2010 meropenem-based schemes allowed for significantly higher rates of appropriate/adequate therapy in critically ill patients especially those with severe nosocomial infections, infected with multidrug-resistant microorganisms¹². Meropenem tends to provide better antibiotic coverage for spontaneous bacterial peritonitis in severe patients with cirrhosis when compared with third generation cephalosporin¹³, and for other sepsis due to secondary peritonitis¹⁴.

Although there has been several reports dealing with the increasing resistance to meropenem, in the last two years, from microorganisms that grow in intensive care units and hospital facilities, this antimicrobial substance still is one of the best empirical drug for first option for severe critically infected ill patients without knowing the bacteriological tests¹⁵.

The purpose of this investigation was twofold: 1 – to investigate the impact of increasing age of a rat model for autogenously fecal peritonitis; and 2 – to analyze the effect of intravenously meropenem in rats from different ages that have undergone to severe peritonitis.

Methods

The research was approved by the Institutional Research Ethics Committee of Animal Experimentation of FCM, Campina Grande-PB. This was a prospective, analytical and experimental study.

Adult Wistar rats (*Rattus norvegicus*, *rodentia mammalia*) from the animal house were used for this study. They were housed in polypropylene cages, four animals per cage, under standard light/dark conditions (lights on 7:00, off 19:00) with food pellets and water *ad libitum*. One rat had to be excluded because it presented with a tooth malformation and developed malnutrition. It was replaced by other animal from the same litter.

Peritonitis was induced, in 30 inbred rats stratified in three groups of 10, - group I with chronological age of six months; group II with chronological age of 12 months, and group III with chronological age of 18 months, by intra-peritoneal inoculation of a 10% suspension of autogenously feces. Two grams of stools were collected for each own individually rat and dissolved in 20 ml of 0.9% saline solution. This mixture was homogenized and filtered through gauze in order to remove large particles. It was injected 6 ml/kg of the suspension in the intra-peritoneal cavity, in the left iliac quadrant, using a 30 x 12mm needle. The rats had to have regular bowel habits and no macroscopic feces changes (blood, mucus or pus).

After eight days following induction of autogenously fecal peritonitis it was injected intravenously (iv) meropenem at a single dosage of 40 mg/kg. This protocol was done in groups I and II. However, in group III, it was changed because of the high mortality of these old animals in the first two days following peritonitis induction. The six animals that survived after 24 h received IV meropenem (40 mg/kg) daily. Two old rats that were still alive in the third day after autogenously fecal peritonitis received another intravenous shot of meropenem.

The animals were observed, by the veterinary, as regard to: activity, body weight and temperature, respiratory rate and hair status, with the goal of obtaining signs of serious infection.

The animals that died before and after antibiotics treatment and those that survived for 45 days after fecal peritonitis induction were euthanized for abdominal and thorax inspection for: abscess identification, adhesions and macroscopic infection signs like pus inside or in the solid organs. Photos were taken for documentation.

To stratify morbidity and mortality it was used a modified protocol validated previously¹⁶.

Score 0 - Animals that died of septic shock in the first 24 hours after induction of fecal peritonitis;

Score 1 - Animals that died from septic shock between 24 and 48 hours after induction of peritonitis;

Score 2 - Animals that died between 48 hours and eight days after the induction of peritonitis, with obvious clinical signs of serious infection;

Score 3 - Animals that died between eight and 45 days after the induction of peritonitis, with obvious clinical signs of serious infection;

Score 4 - Animals that survived until 45th day, but still have positive blood culture, with moderate clinical signs of infection and after the euthanasia have abscesses inside the abdomen and thorax cavities.

Score 5 - Animals that survived until 45th day after the induction of fecal peritonitis and still have positive blood culture, with no clinical signs of infection, but after the euthanasia, abscesses inside the abdomen and thorax cavities were observed;

Score 6 - Animals that survived until 45th day after the induction of fecal peritonitis and still have positive blood culture, no clinical signs of infection and after the euthanasia, abscesses only inside the abdomen cavity were observed;

Score 7 - Animals that survived until 45th day after the induction of fecal peritonitis but has negative blood culture, no clinical signs of infection and after the euthanasia, abscesses inside the abdomen and thorax cavities were observed;

Score 8 - Animals that survived until 45th day after the induction of fecal peritonitis, have negative blood culture and after the euthanasia, however abscesses were only observed inside the abdomen cavity;

Score 9 - Animals that survived until 45th day after the induction of fecal peritonitis, have negative blood culture and after the euthanasia, and only one small abscess was observed inside the abdomen cavity;

Score 10 - Animals that survived until 45th day after the induction of fecal peritonitis, have negative blood culture and after the euthanasia, abscesses inside the abdomen and thorax cavities were not observed.

The scores were expressed by their mean and standard error of the mean (SEM) and the qualitative by their frequencies. For assessing the mean difference it was used Mann Whitney test. The significance level was 95% ($p \leq 0.05$).

Results

The mortality in groups I and II was no different. One (10%) rat from each group died before eight days after the severe autogenously fecal peritonitis. The survival animals from both

groups were apparently healthy and gaining weight after 45 days post peritonitis induction and had received an intravenous single dosage of meropenem in the 8th day of this event. The residual findings of peritonitis on the inventory of the abdominal and thorax cavities although tended to be more impressive (residual signs of severe infection) on rats from group II (twelve-month old), however the mean scores difference of morbidity and mortality did not reach statistical significance [(Group I - 7.400 ± 0.968 versus Group II - 7.700 ± 0.803) - Mann Whitney U test = 47.50 - $p=0.8657$]. Figures 1 to 7.



FIGURE 1 - Several large residual abscesses in the small gut mesentery (group I). Rat living normal life.



FIGURE 2 - Orange petechiae in the liver (group I). Rat living normal life.



FIGURE 3 - Orange petechiae in the liver (group I) and scar and residual abscesses in the right lung. Rat living normal life.

Mascena GV *et al.*



FIGURE 4 - Multiple residual abscesses in the spleen (group II). Rat living normal life.



FIGURE 5 - Multiple left lung abscesses (group II). Rat living normal life.



FIGURE 6 - Diffuse residual abscesses in the right kidney, changing the natural color of this organ (group II). Rat living normal life.

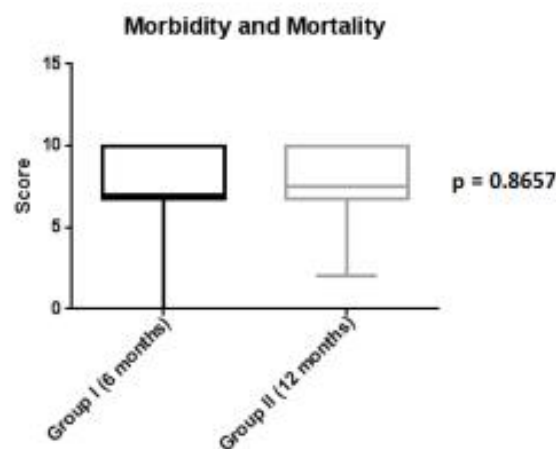


FIGURE 7 - Box plot expressing no significant difference between the measures of central tendency for scores of both groups.

The more frequent gross findings in the abdomen and the thorax cavities in the necropsy analysis in the survival rats from both groups were: a) Adhesion from the small gut to the parietal peritoneum; b) Multiple abscesses in the lungs; b) Residual scar from abscesses in the lungs; c) Orange petechiae in the liver; d) Retroperitoneal abscesses; e) Orange petechiae in the kidney; f) Infrarenal abscesses; g) Residual kidney abscesses; h) Single or multiple mesenteric abscesses; and i) Splenic abscesses.

In group III (elderly group composite of obese and sedentary animals), four (40%) rats died after 24 hours of peritonitis induction. Two (20%) animals died about 28 hours after peritonitis induction, but they already have received an intravenously shot of meropenem (40 mg/kg), four hours before death. One animal (10%) died at 36 hours of peritonitis induction and 12 hours following meropenem injection. One (10%) more rat died 24 hours after meropenem shot (48 h after peritonitis induction). The two (20%) survival rats received three shots of intravenously meropenem at the same dosage, 24 h, 48 h, and 72 h after peritonitis induction and they lived for the 45 days according to protocol when they were euthanized for inventory of abdomen and thorax cavities.

Necropsy studies on the eight elderly rats that died in the first 48 hours after peritonitis induction revealed a turbid liquid into the abdominal cavity and collapsed hemorrhagic lungs with orange patches on the surface (Figures 8 and 9).

Severe autogenously fecal peritonitis in ageing Wistar rats. Response to intravenous meropenem



FIGURE 8 - Left lung surface showing hemorrhagic and orange patch areas.



FIGURE 9 - Closer view of the right lung surface showing diffuse hemorrhagic organ and orange patch areas.

The inventory of the abdomen and thorax cavities, after 45 days survival, showed: in one rat a large (4 cm x 3 cm) resolving abscess located in the posterior retroperitoneal area just in the left inferior quadrant of the abdomen and resolving abscess lesions on the surface of both lungs; in the other it was observed two small abscesses in the mesentery binding different small bowel segments and also resolving abscess lesions on the surface of both lungs. Both animals were gaining weight and were presenting normal behavior (Figures 10 and 11).



FIGURE 10 - **A.** Large retro-peritoneal abscess in the left lower abdominal quadrant was observed. **B.** After opening the abscess there was drainage of necrotic purulent mass.



FIGURE 11 - Several abscesses was observed in the surface of lung.

Discussion

Populations encompassing elderly, have greater mortality from sepsis. The increased mortality observed in this population after sepsis is due to fundamental differences in host-protective immunity and is manifested at the level of the leukocyte transcriptome. In mice, elderly exhibited significantly greater mortality to sepsis. Elderly mice are more susceptible to abdominal peritonitis associated with no significant differences in the magnitude of the inflammatory response, reduced bacterial

Mascena GV *et al.*

killing, reduced early myeloid cell activation, and a persistent inflammatory response that failed to resolve. Considering these differences as fundamental aspects of the genomic response to sepsis, interventional therapies will require individualization based on the age of the population^{2,17}.

Ageing, in mice, affects every innate immune cell, including changes in cell numbers and function. Defects in the function of some cells are intrinsic, whereas for other cells, defects are extrinsic and possibly the consequence of the complex interactions with other cell types or the environmental milieu that is altered with aging. Abnormal function contributes to worsened outcomes after injury or infection and leads to diseases observed in the elderly¹⁸. The results from the present investigation give support to the hypothesis that the same kind of impaired immune response occurs in other elderly rodents, such as rats.

In human beings the factors influencing mortality from secondary bacterial peritonitis shows dominance of host related factors over the type and source of infection with high risk population identified by age over 60 years^{2,3,19}. Even in mild very common surgical emergency such as appendicitis frequently seen in young adults, in whom the outcomes are usually good, in elderly this disease is becoming more prevalent and, it is far more serious requiring an early diagnosis and treatment, and even so associated with a mortality rate of about 3%, and post-operative complication around 20%²⁰.

It has been understandable the knowledge that the immune system declines with age, a term known as immunosenescence, which leads to a higher incidence of infections, neoplasia and autoimmune diseases¹.

The results from the present investigation make evident that the rats in group III (elderly) presented with a marked impaired immune response to the infectious challenge induced by the autogenously fecal peritonitis at the dosage of 6ml/kg. For keeping two (20%) elderly rats alive it was necessary to break down the initial protocol and injecting three shots of intravenous meropenem (40mg/kg) at post peritonitis induction, days 2 to 4. Although this outcome would be expected, it is necessary to assess the used model as regard to elderly rats. The usual dosage of autogenously 10% fecal suspension for testing therapeutically intervention is 5 ml/kg^{6,21}. In these papers the rats included in the investigation weighed 300g to 330g, however there was no mention to the ages of the rats in some studies^{3,6}, and in other the rats were very young (between two and three months). In the present study it was followed a previous protocol¹⁶, in which it was produced a severe peritonitis and sepsis, but the rats were young (around 12 month-old). One limitation of this investigation

was not foreseeing that the 6 ml/kg of 10% autogenously fecal suspension for producing severe peritonitis was an overwhelming infectious insult that the older rats could not overcome for the first 48 h post peritonitis induction, thus not allowing true comparison with the other two young rat groups that received intravenously meropenem after seven days post peritonitis induction.

One should speculate that in the elderly rats (18 month-old or more) the infectious insult could be done with a smaller dosage of 10% fecal suspension (4ml or 5ml per kilogram of rat), and the antimicrobial intervention should be earlier than seven days after peritonitis induction. Otherwise, the mortality of the elderly rats could be high at early time after peritonitis induction, as it happened in the present study, not allowing observations that would provide needed translational information for older septic human being.

Although the relationship between rat age and chronological age in human beings has been estimated in one rat day for 30 human days, there are other conversions that state this relation, in rat adult phase, could be 11.8 rat days = 1 human year²². In this study, using the conventional rate of conversion, the correspondence of rat age/human age, the translational information for human being age chronology would be: group I 18 year-old, group II 30 year-old, and group III 45 year-old. Notably, in the present investigation, the immune defense behavior of the older rats (group III) was of elderly people with impaired immune response (immunosenescence). Nevertheless, taking into account that the older rats were obese and sedentary, probably bearing comorbidities, the corresponding age for human beings should be in group III $\geq$ 45 year-old²². This rate of age rat/human conversion could be more appropriate for explaining the early impaired immune response of the older rats in the present investigation.

In this regard, for researchers who are working with experimental infection, age in rats²² is crucial for making analyses of the outcomes. The results from a therapeutically intervention can be absolutely different in some papers dealing with young animals when compared with other working with older rats. Thus, immune response to infection, in rats, can only be comparable if ages are stated in the investigation.

Conclusions

The treatment of severe autogenously fecal peritonitis with a single dosage of intravenous meropenem (40 mg/kg) reached reasonable results in rats with six and twelve months of age, even considering residual abscesses on abdomen and thorax cavities. However, the great majority of elderly rats could not overcome the

Severe autogenously fecal peritonitis in ageing Wistar rats. Response to intravenous meropenem

initial severe infectious challenge, proving that ageing is a very important risk factor for impairing immune response. Thus, sepsis remains a challenging situation, especially in elderly, and working with experimental infection in rat model increasing age play a key role in the outcome interpretation.

References

1. Oaks WW, Cohen HE. Endotoxin shock in the geriatric patient. *Geriatrics*. 1967;22:120-130. PMID: 5335496.
2. Aw D, Silva AB, Palmer DB. Immunosenescence of ageing. *J G Pathol*. 2007 Apr;120(4):435-46. PMID: 17313487.
3. Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing. *J G Pathol*. 2007 Jan;211(2):144-56. PMID: 17200946.
4. Wei CL, Gilliam MC, Cohen MD, Cornell JA, Moazam F. A preliminary study of age-related difference in resistance to sepsis in the rat model. *J Surg Res*. 1987 Nov;43(5):460-7. PMID: 3316844.
5. Kreimer F, Aguiar JLA, Castro CMMB, Lacerda CM, Reis T, Lisboa Júnior F. Therapeutic and inflammatory response in rats with secondary peritonitis and topical use of ampicillin/sulbactam. *Acta Cir Bras*. 2005;20 Suppl 1:63-71. doi: org/10.1590/S0102-86502005000700007.
6. Brocco MC, Gomez RS, Paulo DN, Almeida CE, Baptista JF. Histological features of peritoneal lavage with ropivacaine in rats with fecal peritonitis. *Acta Cir Bras*. 2012 Feb;27(2):193-9. doi: org/10.1590/S0102-86502012000200016.
7. Perdue PW, Perdue PW, Kazarian KK, Nevela J, Law WR, Williams T. The use of local and systemic antibiotics in rat fecal peritonitis. *J Surg Res*. 1994 Sep;57(3):360-5. PMID: 8072283.
8. Araujo ID, Grossi GCX, Dimiz SOF, Nunes TA, Braga EA, Cardoso VN. Effects of the povidone-iodine (PVPI) in treatment of bacterial peritonitis induced in rats. *Acta Cir Bras*. 2010 Aug;25(4):322-7. doi: org/10.1590/S0004-28032005000200006.
9. Hyde SR, Smith RD, McCallum RE. Mortality and bacteriology of sepsis following cecal ligation and puncture in aged mice. *Infect Immun*. 1990 Mar;58(3):619-24. PMID: 2307515.
10. Pidhirnyia, Baryliak R, Makovets'kyi I, Shershen' H, Pidhirna M. Possibilities of combined and isolated application of carbapenems in patients with secondary widespread peritonitis. *Klin Khir*. 2009 Mar;3(3):28-33. PMID: 19673118.
11. Guery BP. Doripenem: need for a new carbapenem. *Med Mal Infect*. 2009 Dec;39(12):891-6. doi: 10.1016/j.medmal.2009.08.014.
12. Yang Q, Wang H, Chen M, Ni Y, Yu Y, Hu B, Sun Z, Huang W, Hu Y, Ye H, Badal RE, Xu Y. Surveillance of antimicrobial susceptibility of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections in China: the 2002-2009 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Dec;36(6):507-12. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.09.001.
13. Badawy AA, Zaher TI, Sharaf SM, Emara MH, Shaheen NE, Aly TF. Effect of alternative antibiotics in treatment of cefotaxime resistant spontaneous bacterial peritonitis. *World J Gastroenterol*. 2013 Feb 18;19(8):1271-7. doi: 10.3748/wjg.v19.i8.1271.
14. Castagnola E, Bandettini R, Gimocchio F, Perotti M, Masa DL, Ciucci A, Loy A, Caviglia I, Haupt R, Guida E, Pini Prato A, Mattioli G, Buffa P. Susceptibility to antibiotics of aerobic bacteria isolated from community acquired secondary peritonitis in children: therapeutic guidelines might not always fit with and everyday experience. *J Chemother*. 2013 Aug;25(4):213-6. doi: 10.1179/1973947813Y.0000000083.
15. Tuon FF, Rocha JL, Leite TM, Dias C. A simple mathematical model to determine the ideal empirical antibiotic therapy for bacteremic patients. *Braz J Infect Dis*. 2014 Jul-Aug;18(4):360-3. doi: 10.1016/j.bjid.2013.11.006.
16. Cavalcanti MMCS, Gadelha DB, Oliveira TKB, Brandt CT. Severe autogenously fecal peritonitis in Wistar rats with permanent bilateral carotid occlusion. Response to intra peritoneal moxifloxacin combined with dexamethasone. *Acta Cir Bras*. 2014 Feb;29(2):76-81. doi: 10.1590/S0102-86502014000200001.
17. Gentile LF, Nacionales DC, Lopez MC, Vanzant E, Cuenca A, Cuenca AG, Ungaro R, Szpila BE, Larson S, Joseph A, Moore FA, Leeuwenburgh C, Baker HV, Moldawer LL, Efron PA. Protective immunity and defects in the neonatal and elderly immune response to sepsis. *J Immunol*. 2014 Apr 1;192(7):3156-65. doi: 10.4049/jimmunol.1301726.
18. Kovacs EJ, Palmer JL, Fortin CF, Fülöp T Jr, Goldstein DR, Linton PJ. Aging and innate immunity in the mouse: impact of intrinsic and extrinsic factors. *Trends Immunol*. 2009 Jul;30(7):319-24. doi: 10.1016/j.it.2009.03.012.
19. Omari AH, Muhammad R Khammash MR, Qasaim GR, Ahmad K, Shammari AK, Yaseeb MKB, Hammori SK. Acute appendicitis in the elderly: risk factors for perforation. *World J Emerg Surg*. 2014 Jan 15;9(1):6. doi: 10.1186/1749-7922-9-6.
20. Ramakrishnaiah VP, Chandrasekhar C, Dharanipragadha K, Sistla S, Krishnamachari S. Community acquired bacterial peritonitis in a tertiary hospital of South India: an audit with special reference to peritoneal fluid culture. *Trop Gastroenterol*. 2012 Oct-Dec;33(4):275-81. PMID: 23923354.
21. Carneiro BGM, Petrolani A, Rodrigues FHOC, Rocha RF. Estudo comparativo entre diversos tipos de tratamento para peritonite fecal em rato. *Rev Col Bras Cir*. 2002;29(1):43-48. doi: org/10.1590/S0100-69912002000100009.
22. Sengupta P. The Laboratory Rat: Relating Its Age With Human's. *Int J Prev Med*. Jun 2013;4(6):624-30. PMID: 23930179.

Correspondence:

Carlos Teixeira Brandt
Avenida Boa Viagem, 5030/1302
51011-000 Recife - PE Brasil
Tel.: (55 81)3342-0830
carlosbrandt@bol.com.br

Received: Apr 18, 2014

Review: Jun 18, 2014

Accepted: July 22, 2014

Conflict of interest: none

Financial source: Medical Sciences, Faculty of Campina Grande

*Research performed at Experimental Research Unit, Campina Grande Faculty of Medicine (FCM), Campina Grande-PB, Brazil. Part of Master degree thesis, Postgraduate Program in Surgery, Federal University of Pernambuco (UFPE). Tutor: Prof. Carlos Teixeira Brandt.

