

CAMILA FERREIRA LEITE

**PADRONIZAÇÃO DE MODELO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DA
INFLAMAÇÃO EM PROCEDIMENTOS OPERATÓRIOS PULMONARES
DE LONGA DURAÇÃO**

CAMPINAS

2010

CAMILA FERREIRA LEITE

**PADRONIZAÇÃO DE MODELO EXPERIMENTAL PARA ESTUDO DA
INFLAMAÇÃO EM PROCEDIMENTOS OPERATÓRIOS PULMONARES
DE LONGA DURAÇÃO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências, área de concentração Fisiopatologia Cirúrgica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. RICARDO KALAF MUSSI

CAMPINAS

Unicamp

2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

L536p Leite, Camila Ferreira
Padronização de modelo experimental para estudo da inflamação em procedimentos operatórios pulmonares de longa duração / Camila Ferreira Leite. Campinas, SP : [s.n.], 2010.

Orientador : Ricardo Kalaf Mussi
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Modelos animais. 2. Cirurgia torácica. 3. Inflamação. 4. Pulmão. 5. Ratos. I. Mussi, Ricardo Kalaf. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Título em inglês : Standardization of an experimental model to study inflammation in prolonged pulmonary operative procedures

- Keywords:** • Models, animal
- Thoracic surgery
 - Inflammation
 - Lung
 - Rats

Titulação: Mestre em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Cirúrgica

Banca examinadora:

Profº. Drº. Ricardo Kalaf Mussi

Profº. Drº. Evaldo Marchi

Profº. Drº. Pedro Paulo Martins de Oliveira

Data da defesa: 26-11-2010

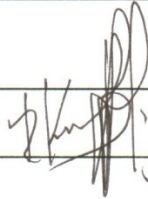
Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

CAMILA FERREIRA LEITE

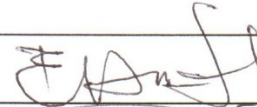
Orientador: Prof. Dr. Ricardo Kalaf Mussi

Membros:

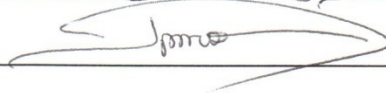
1. Prof. Dr. Ricardo Kalaf Mussi -



2. Prof. Dr. Evaldo Marchi -



3. Prof. Dr. Pedro Paulo Martins de Oliveira -



Curso de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 26/11/2010

Dedico este trabalho...

*Aos meus pais **Olga** e **Vilson**, por sempre acreditarem e confiarem em mim. Sem nunca terem tido qualquer oportunidade de estudo e, mesmo não entendendo muito sobre esta tal “Pós-Graduação” não mediram esforços para me verem realizada profissionalmente. Sinto muito orgulho de vocês e sou profundamente grata a tudo que fizeram por mim.*

*Ao **Shamyr**, meu marido e grande incentivador, referencial de determinação e coragem. Sua paixão pela pesquisa é contagiante e você é o grande responsável por esta minha conquista.*

*Aos meus “velhos” irmãos **Carol** e **Neto** pelas nossas “Lembranças e Andanças”. Ao pequeno **Thomás**, que trouxe ainda mais alegria à nossa família.*

*Às queridas tias **Maria** e **Edi**, por todo carinho. Vocês são muito especiais.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor **Dr. Ricardo Kalaf Mussi**, orientador desta pesquisa. O respeito e admiração cultivados pelo médico foram multiplicados na oportunidade de conhecê-lo e tê-lo como amigo. Agradeço a paciência e boa vontade que sempre demonstrou ao me atender e por todos os ensinamentos brilhantemente transmitidos ao longo destes anos. Desejo sinceramente que tenhamos muitas outras oportunidades para trabalharmos juntos e assim partilharmos desta “entusiasmante inquietude científica”.

Ao **prof. Dr. Ivan F.C. Toro** pela oportunidade de pesquisa na Cirurgia Torácica e por sempre estar disposto a me ajudar. Agradeço a ótima convivência que temos.

Ao **prof. Dr. Edson Antunes**, pela possibilidade de utilizar o laboratório de Inflamação da Farmacologia para o desenvolvimento desta pesquisa assim como pela imprescindível contribuição científica oferecida.

Ao amigo e **prof. Dr. Enilton A. Camargo**, pela imensa ajuda oferecida na fase inicial desta pesquisa e por ter sido um dos grandes responsáveis pelo desenvolvimento deste modelo experimental. Meu sincero agradecimento!

À **Dra. Rosana C. Morandin**, que sempre atendeu a todas as minhas solicitações e muito me ensinou sobre pesquisa envolvendo modelo experimental.

À **profa. Dra. Angélica F.A. Braga** pela indispensável contribuição na elaboração do procedimento anestésico-cirúrgico desta pesquisa.

À **Dra. Lourdes Dias**, pela gentil contribuição nas dosagens gasométricas, me possibilitando notável enriquecimento dos dados da pesquisa.

Aos profissionais do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Unicamp **Willian** e **Ana** pela atenção e ajuda dispensadas.

Ao **prof. Dr. Joaquim Murray Bustorff-Silva**, a quem sou muito grata pela imensa colaboração na condição de coordenador da Pós-Graduação em Cirurgia.

AGRADECIMENTOS

Aos engenheiros **Jorge Bonassa** e **Lisa Iwata**, da empresa Intermed® pelas adaptações no ventilador mecânico utilizado no modelo.

Às amigas da Farmacologia **Dalize, Glaucia, Marina, Letícia, Tatiana, Maria Andréia** e **Fabiola** as quais agradeço não apenas pelo apoio científico, mas também por tornarem nossa “atmosfera de trabalho” tão agradável. Que nas andanças da vida possamos nos encontrar muitas outras vezes.

Às secretárias **Lenice de Souza** e **Maria K.A. Kac** (Depto. Cirurgia) e **Paula Léa Flauzino da Costa Ferreira** (Pós-Graduação em Cirurgia) pela atenção e gentileza com que sempre me atenderam.

À **Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)**, renomada instituição em cujas instalações encontrei todo o suporte necessário ao desenvolvimento desta pesquisa e onde tive a oportunidade de conhecer pessoas brilhantes que comigo compartilharam seus conhecimentos.

Agradeço ainda a fundamental contribuição das agências de fomento **CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)** pela bolsa de Mestrado recebida e **FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)** pelo financiamento do Projeto Regular de Auxílio à Pesquisa (processo nº 2007/58534-0) garantindo subsídios para a conclusão deste estudo, que configura parte inicial do projeto desenvolvido.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a execução desta pesquisa e que não estão aqui citados. Meu sincero muito obrigada!

*“Graças vos dou, **Senhor**, por serdes a fonte de que dimana todo o bem que me sucede. Os que esperam no **Senhor** renovam suas forças, sobem com asas de águias, correm e não se cansam, caminham e não se fatigam”. (Profeta Isaías)*

"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem.

Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".

(Fernando Pessoa)

RESUMO

A cirurgia experimental surge como excelente alternativa em busca de resposta a importantes dúvidas da atividade médica. Contudo, modelos experimentais em animais de pequeno porte estão padronizados para procedimentos de curta duração, sendo necessárias adaptações para tempos operatórios prolongados. **Objetivo:** Avaliar a resposta inflamatória pulmonar e sistêmica imediata após período operatório de longa duração. **Métodos:** Ratos Wistar do grupo experimental foram anestesiados e submetidos à traqueostomia, toracotomia e permaneceram em ventilação mecânica por 3 horas. O grupo controle não foi submetido ao protocolo operatório. Os seguintes parâmetros foram avaliados: atividade da mieloperoxidase pulmonar, níveis de extravasamento de proteínas séricas pulmonares, relação peso pulmonar úmido/seco e medidas dos níveis séricos de citocinas. **Resultados:** Os animais operados apresentaram menor extravasamento de proteínas séricas nos pulmões comparados aos animais controle. A relação peso pulmonar úmido/seco e a atividade de mieloperoxidase não diferiram entre os grupos. As citocinas séricas IL-1 β , TNF- α e IL-10 não foram quantificáveis nos grupos, enquanto que IL-6 só foi detectada no soro dos animais operados. **Conclusão:** Padronizamos um modelo experimental de ventilação mecânica em ratos com tempo cirúrgico prolongado que não apresentou alterações inflamatórias locais (pulmonar) e sistêmicas significativas, permitindo avaliar a resposta inflamatória em outros procedimentos da cirurgia torácica.

Descritores: Modelos Animais. Cirurgia Torácica. Inflamação. Pulmão.

ABSTRACT

Experimental surgery has emerged as an excellent alternative to answer important questions raised in the daily medical activity. However, experimental models in small animals are standardized for short surgical procedures, thus adjustments are necessary for prolonged operative times. **Purpose:** To evaluate the immediate pulmonary and systemic inflammatory response after a long-term operative period. **Methods:** Wistar rats in the experimental group were anaesthetized and submitted to tracheostomy, thoracotomy and remained on mechanical ventilation during 3 h. Control animals were not submitted to the operative protocol. The following parameters have been evaluated: pulmonary myeloperoxidase activity, pulmonary serum protein extravasation, lung wet/dry weight ratio and measurement of levels of cytokines in serum. **Results:** Operated animals exhibited significantly lower serum protein extravasation in lungs compared with control animals. The lung wet/dry weight ratio and myeloperoxidase activity did not differ between groups. Serum cytokines IL-1 β , TNF- α , and IL-10 levels were not detected in groups, whereas IL-6 was detected only in operated animals. **Conclusion:** We have standardized an experimental model of mechanical ventilation in anaesthetized rats with a prolonged surgical time that did not produce significant local (pulmonary) and systemic inflammatory changes and permit to evaluate others procedures in thoracic surgery.

Key-words: Models, Animal. Thoracic Surgery. Inflammation. Lung.

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------------|--|
| C5a | Fração do Complemento 5a |
| EPM | Erro Padrão da Média |
| ERN | Espécies Reativas de Nitrogênio |
| ERO | Espécies Reativas de Oxigênio |
| FAP | Fator Ativador Plaquetário |
| FC | Frequência Cardíaca |
| FiO ₂ | Fração Inspirada de Oxigênio |
| FMSO | Falência Múltiplo-Sistêmica de Órgãos |
| FR | Frequência Respiratória |
| GC | Grupo Controle |
| GE | Grupo Experimental |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de Hidrogênio |
| HOCl | Ácido Hipocloroso |
| ¹²⁵ I | Radioisótopo 125 do iodo |
| ICAM | Molécula de Adesão Intercelular (<i>Intercellular Adhesion Molecule</i>) |
| VCAM | Molécula de Adesão Celular Vascular (<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i>) |
| I:E | Relação Inspiração - Expiração |
| IL-1β | Interleucina-1β |
| IL-6 | Interleucina-6 |
| IL-10 | Interleucina-10 |
| IL-12 | Interleucina-12 |
| LPA | Lesão Pulmonar Aguda |
| MPO | Mieloperoxidase |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo-P |
| O ₂ | Oxigênio Molecular |

| | |
|---------------|--|
| O_2^- | Radical Superóxido |
| OH^- | Radical Hidroxil |
| PA | Pressão Arterial |
| $PaCO_2$ | Pressão Parcial de Gás Carbônico Arterial |
| PaO_2 | Pressão Parcial de Oxigênio Arterial |
| PA | Pressão Arterial |
| PAM | Pressão Arterial Média |
| PEEP | Pressão Expiratória Final Positiva (<i>Positive End-expiratory Pressure</i>) |
| PI | Pressão Inspiratória |
| SDRA | Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo |
| SRIS | Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica |
| TNF- α | Fator de Necrose Tumoral- α |
| UMPO | Unidade de Mieloperoxidase |
| VM | Ventilação Mecânica |
| V/Q | Relação Ventilação/Perfusão |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 1. | Introdução..... | 25 |
| 1.1. | <i>Considerações Gerais.....</i> | <i>27</i> |
| 1.2. | <i>Ética na pesquisa experimental.....</i> | <i>28</i> |
| 1.3. | <i>Opção pela pesquisa experimental e escolha do modelo animal.....</i> | <i>30</i> |
| 1.4. | <i>Cuidados na manutenção do animal em laboratório.....</i> | <i>33</i> |
| 1.5. | <i>Considerações anatômicas do aparelho respiratório do rato.....</i> | <i>34</i> |
| 1.6. | <i>Valores normativos e reações comportamentais do rato</i> | <i>35</i> |
| 1.7. | <i>Ventilação Mecânica</i> | <i>36</i> |
| 1.8. | <i>Anestesia para animais de experimentação</i> | <i>40</i> |
| 1.9. | <i>Cirurgia torácica, inflamação e lesão pulmonar</i> | <i>43</i> |
| 1.10. | <i>Mediadores inflamatórios</i> | <i>48</i> |
| 2. | Objetivos..... | 53 |
| 2.1. | <i>Objetivo geral</i> | <i>55</i> |
| 2.2. | <i>Objetivos específicos</i> | <i>55</i> |
| 3. | Material e Método..... | 57 |
| 3.1. | <i>Animais de experimentação</i> | <i>59</i> |
| 3.1.1. | <i>Grupos experimentais</i> | <i>59</i> |
| 3.1.2. | <i>Adaptação do ventilador mecânico</i> | <i>60</i> |
| 3.1.3. | <i>Parâmetros de ajuste do ventilador mecânico</i> | <i>60</i> |
| 3.2. | <i>Descrição do procedimento operatório.....</i> | <i>61</i> |
| 3.3. | <i>Padronização das amostras para análise inflamatória.....</i> | <i>65</i> |
| 3.4. | <i>Análises inflamatórias</i> | <i>66</i> |
| 3.4.1. | <i>Extravasamento de proteínas séricas e relação peso pulmonar úmido/seco..</i> | <i>66</i> |
| 3.4.2. | <i>Determinação da atividade de MPO.....</i> | <i>66</i> |
| 3.4.3. | <i>Determinação de citocinas séricas</i> | <i>67</i> |

| | | |
|-----------|---|-----|
| 3.5. | <i>Análise estatística</i> | 67 |
| 4. | Resultados | 69 |
| 4.1. | <i>Extravasamento de proteínas séricas</i> | 71 |
| 4.2. | <i>Relação peso pulmonar úmido/seco</i> | 72 |
| 4.3. | <i>Recrutamento neutrofílico: expressão de MPO no tecido pulmonar</i> | 72 |
| 4.4. | <i>Marcadores da inflamação sistêmica</i> | 73 |
| 4.5. | <i>Comportamento gasométrico</i> | 73 |
| 4.6. | <i>Comportamento hemodinâmico</i> | 74 |
| 5. | Discussão | 75 |
| 5.1. | <i>Modelo experimental</i> | 78 |
| 5.2. | <i>Repercussão inflamatória da técnica cirúrgica</i> | 82 |
| 5.3. | <i>Considerações finais</i> | 87 |
| 6. | Conclusão | 89 |
| 7. | Referências Bibliográficas | 93 |
| 8. | Bibliografia de Normatizações | 107 |
| 9. | Anexo | 111 |

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Considerações gerais

A cirurgia experimental surge como uma excelente alternativa na busca de respostas a importantes dúvidas e inquietações observadas na atividade médica diária. O modelo cirúrgico animal, quando bem fundamentado, desenvolvido e adaptado, permite a transposição de seus achados à cirurgia humana.

A criação de um modelo cirúrgico experimental dito “ideal” requer grande busca científica para garantir excelência nas pesquisas advindas de seu uso. Quando bem fundamentado, este modelo permite a reprodução de situações rotineiras da atividade cirúrgica humana impraticáveis apenas com objetivos de estudo devido tanto a questões éticas como também dificuldades práticas.

A excelência da especialidade cirúrgica está na sala operatória, porém a integração com áreas do conhecimento que, de forma partilhada podem solucionar questões para promoção da evolução da Cirurgia Torácica em um campo moderno e integrado do conhecimento, traz muitos benefícios ao trabalho do cirurgião.

A revisão literária aponta grande número de trabalhos experimentais envolvendo anestésicos e manipulações cirúrgicas de curta duração. Adaptar estes modelos para protocolos mais prolongados tem representado um grande desafio para muitos pesquisadores que se interessam pela realização de protocolos semelhantes ao humano.

1.2. Ética na pesquisa experimental

As pesquisas científicas utilizando animais de laboratório estão em expansão devido a uma série de fatores, dentre eles, a melhora progressiva do suporte anestésico, a sofisticação de materiais para monitorização contínua no intra-operatório além da busca dos cientistas por modelos que reproduzam condições mórbidas da espécie humana (1). Todos esses fatores sumarizam a visão da comunidade científica atual, preocupada com a aplicabilidade de seus achados bem como com a minimização do sofrimento animal.

Anteriormente ao século XIX não se tem registro de qualquer legislação que garantisse proteção ao animal. Em 1822 Martin foi o autor da primeira lei que demonstrou esta preocupação, porém restrita a animais de grande porte (2). A revisão histórica mostra que em 1876 surgiu a primeira manifestação social contra as pesquisas que provocariam dor em animais vertebrados e denominou-se *Cruelty Animals Act* (1, 3, 4). Pelo extremismo apresentado, esta manifestação não obteve apoio dos cientistas e tampouco do governo (3).

Apenas no século XX um Código de Ética na Medicina se destacou e obteve boa aceitação internacional (3). Trata-se do Código de Nüremberg, criado em 1947 e ainda muito mencionado nos dias atuais, uma vez que marcou um período de grandes investigações científicas. Este código previa que a experimentação humana deveria ser baseada na experimentação anterior em animais (1). Contudo, para evitar que os cientistas seguissem essa orientação indiscriminadamente, no ano de 1959, Russel e Burch afirmaram que uma boa pesquisa com animais deveria respeitar os três R(s): 1. *Replacement* – substituição – ou seja, opção por animais filogeneticamente mais primitivos e, sempre que possível, o apoio de experimentos simulados, embasados em avanços tecnológicos; 2. *Reduction* – redução – utilização do menor número de animais

na pesquisa; 3. *Refinement* - refinamento – ou seja, empenho no desenvolvimento e utilização de dispositivos que minimizam o sofrimento do animal (2, 3).

Em 1964, na Finlândia, foi criado outro importante código de ética: a Declaração de Helsinki. Ela ajustou os parâmetros básicos aceitos internacionalmente para todas as pesquisas em humanos, e destacou que o progresso médico estaria baseado na pesquisa, a qual deveria ser amparada na experimentação envolvendo a espécie humana, com abrangência dos princípios conhecidos e aceitos na literatura e, quando apropriado, utilizando-se da experimentação animal adequadamente desenvolvida (3,5). Convencionou ainda que alguns estudos em humanos apenas seriam executados depois da observação preliminar de sua segurança e eficácia em experimentos animais (5). Este código foi revisado nos anos de 1975, 1983 e 1989 (3).

Em 1979 criou-se na Suécia a primeira Comissão de Ética em Pesquisa Animal (4), com o intuito de aprimorar e determinar as condições necessárias para os cuidados com animais. Estas comissões são institucionalizadas em muitos países e trabalham com a regulamentação da conduta de experimentos animais (6).

No Brasil, os comitês de ética e pesquisa animal surgiram apenas na década de 90. O Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) descreve em seus artigos referentes à ética em pesquisa animal muitos cuidados e ponderações que o pesquisador deve seguir em seus ensaios. Um dos pontos-alvo refere-se à determinação da relevância do estudo para a saúde animal e humana, assim como para o retorno da pesquisa em conhecimentos ou benefícios à comunidade. Destaca que o pesquisador responde moralmente por suas escolhas e atitudes durante a pesquisa, exigindo ações cautelosas como, por exemplo, complementação com analgésicos, anestésicos ou

sedativos para procedimentos potencialmente dolorosos e garantia de saúde e conforto aos animais a partir de condições de armazenamento ideais (4).

Apesar de todos os rigorosos controles dos comitês de ética assegurando uma pesquisa responsável envolvendo o uso de animais, algumas manifestações no campo científico apóiam a proibição deste tipo de pesquisa (7). Morrison (8) afirma que os pesquisadores contrários ao uso de animais na ciência se apóiam em detalhes únicos de pesquisas isoladas e extrapolam estas conclusões em generalidades. Afirma ainda que toda e qualquer discussão advinda deste tema deva necessariamente focar a técnica, o instrumento, a dosagem da droga, ou qualquer outra intervenção isolada e não a experimentação como um todo. Enfatiza que quando os resultados da pesquisa são aplicados a seres humanos, não se deve negar o valor do trabalho precedente e declara que a medicina não pode progredir sem a experimentação animal (8).

1.3. Opção pela pesquisa experimental e escolha do modelo animal

O modelo animal é capaz de suprir uma série de limitações da pesquisa com a espécie humana, relacionadas tanto a questões éticas como a fatores inerentes da doença. Além de garantir uma amostra bastante homogênea resultante da aplicação de técnicas, dosagens de drogas, tempos de intervenção cirúrgica entre outras variáveis perfeitamente controladas, a pesquisa experimental ainda se destaca positivamente em situações específicas. São exemplos: a facilidade de acompanhamento de uma determinada amostra significativa durante um período de tempo específico; menores entraves na adoção de grupos controle ou placebo em pesquisas intervencionistas bem como na execução de estudos que proponham alternativas de tratamento (9). Além disso,

a agilidade na reprodução de resultados é mais um fator vantajoso encontrado na pesquisa experimental comparativamente ao estudo clínico. Pode-se considerar que, diante das dificuldades envolvidas na pesquisa com seres humanos, os modelos animais possuem papel fundamental em estudos futuros (10).

A escolha do modelo animal ideal requer uma série de considerações a respeito dos propósitos e objetivos do experimento. Contudo, a pesquisa animal não é a única alternativa para substituir o modelo humano. Outras formas de experimentação, como modelos *in vitro*, por exemplo, poderão ser adotados preferivelmente caso não haja prejuízo ao experimento (3). Porém, se constatada a necessidade de pesquisas *in vivo*, a escolha do modelo animal deverá considerar subsídios de literatura que apontarão os benefícios de cada espécie. Existindo mais de uma opção que satisfaça as necessidades do experimento, o pesquisador deve optar pelo modelo animal que apresente escala evolutiva inferior (3, 11).

Quanto maiores as semelhanças fisiológicas, anatômicas e orgânicas em relação ao ser humano, melhor será a aplicabilidade das conclusões obtidas com o estudo experimental (1). Isso não quer dizer que a proximidade filogenética é garantia de validação dos resultados com conseqüente extrapolação para o ser humano. O que é importante para modelos animais é que o comportamento dos fenômenos que estão sendo estudados seja semelhante à espécie alvo (9).

A grande maioria das pesquisas – cerca de 90% do total – é realizada com animais de pequeno porte. Os custos para aquisição e manutenção destes animais em laboratório tornam a pesquisa mais viável (1, 2). Um levantamento realizado nas bases de dados incluindo Medline (National Library of Medicine – USA), Lilacs (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde), SciELO (Scientific Eletronic Library

Online) e Biblioteca Cochrane (The Cochrane Database of Systematic Reviews) no período de 1998 a 2002 apontou que o rato foi o animal mais usado em pesquisa e que 85% dos artigos da Medline e 70,5% dos artigos da Lilacs referiam-se a ratos e camundongos (9).

Uma das vantagens do crescimento da utilização do rato com finalidade científica é que, assim como os camundongos, eles estão geneticamente bem caracterizados e permitem a realização de procedimentos que são realizados com dificuldade maiores em camundongos (12). A partir de experimentos realizados com ratos é possível desenvolver estudos relacionados à fisiologia, neurociência básica, genética, infecções, doenças hereditárias além de uma série de outras abordagens de estudo. Também configuram bons modelos para estudo de doenças como diabetes, obesidade e hipertensão (13).

Atualmente, muitas pesquisas são realizadas em roedores empregando-se técnicas para tratamento das lesões da medula espinhal, com ênfase na reabilitação da função respiratória, bastante prejudicada neste tipo de dano. Kastner & Gauthier (14) defendem a reprodutibilidade destas pesquisas uma vez que afirmam não existirem diferenças fundamentais na organização do sistema nervoso-respiratório entre ratos e primatas não humanos. Sendo assim, defendem a validação dos estudos com esta espécie animal uma vez que julgam não ser justificável a pesquisa com primatas (14).

Valores em torno de 95% são mencionados referindo-se à similaridade do código genético de homens e ratos. A precisão para estes valores poderá surgir de pesquisas promissoras que foram impulsionadas pelos trabalhos iniciais de mapeamento do código genético humano. Muitos centros de pesquisa empenham-se na descrição e disponibilização do código genético de roedores, pois diante do grande uso desta espécie

em trabalhos experimentais, uma exatidão na seqüência de códigos específicos para determinadas características comparáveis entre as duas espécies pode ser considerada uma ferramenta muito valiosa na certificação dos resultados obtidos em modelos experimentais (15, 16).

1.4. Cuidados na manutenção do animal em laboratório

Para que uma pesquisa renda bons resultados, o armazenamento dos animais em biotério sob condições ideais deve ser o cuidado inicial de qualquer estudo. Schanaider et al. (1) mencionam o estresse como um fator de extrema importância a ser considerado. Animais submetidos a trocas constantes de gaiolas, intensa iluminação, mudanças bruscas de temperatura, superpopulação e barulho desenvolvem reações de canibalismo, variações de ciclo circadiano, alterações hormonais e comportamentais (1). Pesquisas realizadas com animais estressados apresentarão erros em seus resultados e prejudicarão a aferição e interpretação dos dados obtidos (4).

Conhecer a qualidade microbiológica dos animais que serão estudados também é necessário. Vírus, micoplasmas, bactérias, fungos e parasitas são os responsáveis por infecções em coelhos e roedores. A FELASA (Federação das Associações Científicas Européia de Animal de Laboratório) estabelece que as infecções mais relevantes da espécie animal em estudo devem ser testadas a cada três meses e as demais, ao menos anualmente (17).

O controle das variáveis que podem interferir nos dados finais da pesquisa é de responsabilidade do pesquisador. Atribuir diferentes parâmetros como sexo, idade, dieta, tamanho da dose, variação diurna, estação do ano às diferentes espécies ou raças

que estão sendo estudadas ou mesmo aos diferentes grupos de uma amostra leva à divergência de resultados, com conseqüente incredibilidade da pesquisa (9).

1.5. Considerações anatômicas do aparelho respiratório do rato

Em relação à anatomia e fisiologia na árvore broncopulmonar, Dawkins e Stockley (18) afirmam que roedores e humanos tem certamente algumas diferenças, porém as respostas pulmonares destas duas espécies são bastante similares.

O rato apresenta um grande lobo esquerdo com artéria e veia pulmonar. Já o pulmão direito é composto por quatro lobos (superior, médio, inferior e lobo pós-cava) com uma pequena artéria pulmonar comum e duas veias dominantes que drenam numa também pequena veia pulmonar comum (19) (Figura 1). As artérias pulmonares direita e esquerda acompanham lateralmente os grandes brônquios e emitem segmentos para os seus ramos (20).

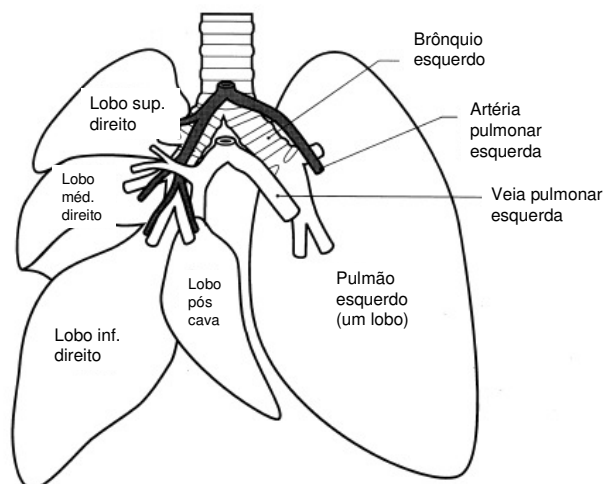


Figura 1: Representação esquemática dos pulmões de rato Fischer. Adaptado de: Nawaka S, Abolhoda A, Ross HM, Brooks A, Burt ME. Sequential bilateral isolated lung perfusion in the rat: an experimental model. *Ann Thorac Surg* 1997; p.797.

A traquéia dos ratos apresenta aproximadamente 24 cartilagens, que se calcificam nos adultos. Estas têm formato de “C” e são unidas posteriormente pelo músculo traqueal transverso. O epitélio presente nas vias respiratórias destes animais é descrito como colunar simples (20). Com relação às vias aéreas inferiores, o número de bifurcações (gerações) encontradas em rato é de 16 (21).

1.6. Valores normativos e reações comportamentais do rato

O quadro 1 a seguir apresenta valores fisiológicos tomados como referência para o rato (13) e para o homem (22).

| Quadro 1 | | Parâmetros fisiológicos normativos | |
|----------------------|-------------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| | | Rato | Homem |
| Respiratórios | Frequência Respiratória | 70 – 110 rpm | 10 – 15 rpm |
| | Volume Corrente | 0,5 – 2,0 mL | 500 mL |
| | Volume Minuto | 75 – 130 mL/min | 6 L/min |
| | Área de Superfície Alveolar | 7,5m ² | 50 – 100 m ² |
| | Capacidade Pulmonar Total | 1,3 ± 1,4mL | 4,2 – 6 L |
| | Capacidade Vital | 8,4 ± 1,7 mL | 2,1 – 4,8 L |
| | Capacidade Residual Funcional | 3,9 ± 0,8 mL | 1,8 – 2,2 L |
| | PaO ₂ | 93,2 mmHg | 75 – 100 mmHg |
| | PaCO ₂ | 39,9 mmHg | 35 – 45 mmHg |
| Hemodinâmicos | Temperatura Corpórea | 36,0 – 37,5 °C | 36 – 37 °C |
| | Débito Cardíaco | 50 mL/min | 5 L/min |
| | Volume Sanguíneo | 6 mL/100g de peso | 5 L |
| | Pressão Arterial Média | 90 – 100 mmHg | 100 mmHg |
| | Frequência Cardíaca | 360 bpm | 70 – 80 bpm |
| Sanguíneos | Glicose | 85 – 132 mg/dL | 75-99 mg/dL |
| | Colesterol | 46 – 92 mg/dL | <200 mg/dL |
| | Albumina | 3,3 – 4,9 mg/dL | 3,5 – 5 g/dL |
| | Sódio | 141 – 150 mEq/L | 137-145 mEq/L |
| | Potássio | 5,2 – 7,8 mEq/L | 3,5 – 5 mEq/L |
| | Células Vermelhas Sanguíneas | 5,4 – 8,5 x 10 ⁶ ul | 4,8 x 10 ⁶ cels/μL |
| | Hemoglobina | 11,5 – 16,0 g/dL | 12 – 16 g/dL |
| | Hematócrito | 37 – 49 % | 38% - 42% |
| | Plaquetas | 450 – 885 x 10 ³ ul | 200 – 500 x 10 ³ cels/μL |
| | Células Brancas | 4,0 – 10,2 x 10 ³ ul | 4000 – 10000 cels/μL |
| | Neutrófilos | 1,3 – 3,6 x 10 ³ ul | 3000 – 6000 cels/μL |
| | Linfócitos | 5,6 – 8,3 x 10 ³ ul | 1500 – 4000 cels/μL |

O conhecimento dos valores normativos e das características comportamentais da espécie estudada é importante para o cientista. Eles são referência das condições de normalidade e quando alterados informam a necessidade de uma intervenção de qualquer natureza por parte do pesquisador (23,24,25).

A dor aguda normalmente se manifesta na presença de um estímulo potente com grande valor adaptativo. O animal reage com retirada reflexiva protetora e estereotipada do membro estimulado, que pode ou não estar associada a uma série de reações como vocalização, fuga, ataque, além de reações autonômicas como aumento da pressão arterial (PA), frequência cardíaca (FC), piloereção, dilatação de pupila, mudanças no padrão respiratório, na taxa de calor, na motilidade gastrointestinal, entre outras (24, 26).

Além destas observações, análises bioquímicas também são indicativos úteis de sofrimento animal, como por exemplos, hormônio adenocorticotrófico aumentados no plasma e alteração nos níveis de corticosteróides e catecolaminas (26). Níveis aumentados de glicocorticóides são um marcador clássico de estresse fisiológico em vertebrados (27).

1.7. Ventilação mecânica

A ventilação mecânica (VM) garante o suporte vital de pacientes incapazes de manter a ventilação alveolar adequada bem como possibilita a realização de diversos procedimentos dependentes de anestesia geral (28, 29). Contudo, é capaz de acarretar tantas complicações ao indivíduo quantos forem os seus benefícios, causando, entre outras coisas, inflamação e liberação de citocinas para a circulação sistêmica (30). Isto

porque a VM por si é responsável pela passagem de líquidos para a cavidade pleural (31), devido às repercussões lesivas na barreira endotelial microvascular e epitelial pulmonar (29). Alterações na permeabilidade vascular pulmonar são observadas tanto em resposta a aplicação de altos volumes como também de altas pressões (32).

Estima-se que aproximadamente 20 a 50% dos pacientes que obtém sucesso na resolução da patologia inicial e que, para isso necessitam suporte ventilatório invasivo, sofrem com as conseqüências problemáticas residuais do uso do ventilador mecânico (33). A VM prolongada é associada a altas taxas de complicações, ocorrendo em muitos casos, dificuldade de descontinuidade do paciente do ventilador mecânico (34).

Evidências apontam que a VM pode ser responsável pela piora da Lesão Pulmonar Aguda (LPA) assim como por vários mecanismos que levam ao desenvolvimento da Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica (SRIS) e da Falência Múltiplo-Sistêmica de Órgãos (FMSO). Os fatores responsáveis por estes danos são basicamente dois: a superdistensão das unidades pulmonares e as forças de estiramento geradas durante repetitivas aberturas e colapsos de regiões atelectasiadas (35).

A LPA é caracterizada por hipoxemia aguda, infiltrados radiográficos consistentes com edema pulmonar, sem elevação da pressão capilar pulmonar. Tem menor gravidade em relação à Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA) (36), que se caracteriza por edema inflamatório pulmonar, hipoxemia severa e lesão endotelial e epitelial difusa (37).

Tendo em vista que o uso da VM é de grande importância para uma série de procedimentos cirúrgicos assim como para suporte da vida em situações de insuficiência respiratória de origens diversas, faz-se necessário o entendimento pleno de seu

funcionamento evitando assim os malefícios advindos de sua inadequada utilização para o pulmão e organismo como um todo (30). O dano pulmonar decorrente do uso inadequado do ventilador mecânico se caracteriza pela infiltração de neutrófilos bem como por níveis elevados de mediadores inflamatórios no lavado broncoalveolar (35).

O uso de pressão expiratória final positiva (PEEP) é um aliado ao uso do ventilador mecânico, pois garante a abertura das vias aéreas distais, mantendo o recrutamento alveolar através de todo o ciclo respiratório. Esta pressão positiva evita o ciclo de abertura e fechamento – recrutamento e derecrutamento – de pequenas vias aéreas, o que poderia aumentar o estresse mecânico no local (29).

O estudo dos diferentes modos de ventilação é tema de muitas pesquisas. Estratégias ventilatórias protetoras demonstraram redução de mortalidade em pacientes com LPA (38) e trouxeram grande benefício aos profissionais nas unidades de terapia intensiva, sendo rotineiramente utilizadas.

Em 1974, um dos estudos experimentais pioneiros de lesão pulmonar induzida por VM observou o aparecimento de edema pulmonar após utilização de ventilação artificial em ratos. Os autores Webb e Tierney trabalharam com pico pressórico de 45 cmH₂O sendo que, posteriormente, na reprodução deste estudo por outros pesquisadores, foi demonstrado lesão significativa e alteração da permeabilidade vascular mesmo com pressões em torno de 25 a 30 cmH₂O (30).

A quantificação da resposta inflamatória resultante da utilização de modalidades ventilatórias específicas também é alvo de pesquisas, como a realizada por Veldhuizen et al. (39) que demonstraram o efeito negativo de volume corrente elevado na ventilação de pulmões isolados de camundongos, constatando que os pulmões

submetidos a grandes volumes apresentaram alterações na composição de surfactante pulmonar e também nos níveis das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (Fator de Necrose Tumoral- α) e IL-6 (Interleucina-6) medidas no lavado pulmonar (39).

Na pesquisa experimental, à semelhança do estudo clínico, os modos de ajuste do ventilador mecânico variam entre os estudos científicos. No caso específico de pesquisas com ratos, são encontrados tanto trabalhos que utilizam ventilação controlada a volume (40) como a pressão (41). O uso de PEEP é bem freqüente nos trabalhos científicos e os valores adotados variam de 2 cmH₂O (42) a 6 cmH₂O (43). A freqüência respiratória (FR) varia de 30 rpm (44) a 80 rpm (45). Já a fração inspirada de oxigênio (FiO₂) entre 21% (45) e 100% (43, 46).

Ajustar os parâmetros do ventilador mecânico a partir de dados gasométricos permite que seja garantido o suporte ventilatório necessário ao animal anestesiado. A interpretação correta dos valores dos gases sanguíneos evita situações agressivas ao animal, como por exemplo, a exposição à elevada concentração de oxigênio. Se mantida por longo período, esta condição causa lesão pulmonar hiperóxica aguda, caracterizada por extravasamento de proteínas plasmáticas provenientes de lesão endotelial e epitelial (47).

Valença et al. (47) apontam como principais efeitos deletérios pulmonares advindos da exposição a altas concentrações de oxigênio o edema pulmonar não cardiogênico, a formação de membrana hialina, o dano ao pneumócito tipo I, hiperplasia do pneumócito tipo II, infiltração neutrofílica, hemorragia alveolar e o aumento da espessura do septo alveolar.

O pesquisador com conhecimento dos valores referenciais gasométricos bem como das possíveis interações metabólicas e respiratórias que fisiologicamente ocorrem, é capaz de ventilar adequadamente o animal sedado e com suporte ventilatório artificial evitando a sobreposição de fatores negativos ao estudo.

1.8. Anestesia para animais de experimentação

A utilização de anestésicos durante pesquisas que envolvam animais de pequeno porte exige cautela do pesquisador. Isto porque estes animais apresentam:

1. altas taxas metabólicas, o que torna o tempo cirúrgico um fator crítico durante a cirurgia;
2. pequenas reservas de glicogênio, o que predispõe à hipoglicemia;
3. presença de ventilação alveolar aumentada e
4. absorção rápida dos anestésicos inalatórios (25).

Em roedores, os anestésicos mais encontrados na literatura são: composição de ketamina e xilasina (43), uretano (48), pentobarbital sódico (49), tiopental (50) e isoflurano (42). Todos eles são capazes de alcançar aprofundamento anestésico e analgesia suficientes para procedimentos cirúrgicos, porém associam-se a fatores positivos e negativos que precisam ser avaliados.

A combinação ketamina e xilasina, por exemplo, permite manutenção do estado anestésico por um período muito curto (27 ± 2 minutos) (51). Outro ponto relevante em relação a esta combinação anestésica é a sua repercussão hemodinâmica. Estudo com ratos revelou redução de 24% na PA sistólica, de 38% na PA diastólica e de 53% na FC após aplicação de ketamina/xilasina. Além disso, os animais apresentaram depressão respiratória verificada pelo aumento de 85% na pressão de gás carbônico além do aumento de 246% nos níveis de glicose (51). A ketamina ainda é responsável por

umentar as secreções salivar e traqueal, sendo indicado o uso concomitante de atropina para minimizar esse efeito (2).

O uretano, um composto solúvel em água, tem como características o fato de interferir minimamente nos parâmetros respiratórios e circulatórios dos animais (52). Uma simples aplicação deste anestésico promove imobilidade para cirurgias de longa duração, não sendo necessárias doses de manutenção. Como ponto negativo, causa elevação de glicose e epinefrina no sangue, além de ser uma substância mutagênica, carcinogênica e hepatotóxica (53).

O tiopental é um anestésico que induz resposta depressora do ponto de vista cardiovascular – efeito inotrópico negativo – em uma grande variedade de espécies como cão, coelho, cobaia e humano (54). Algumas investigações clínicas sugerem que o tiopental aumenta o tono vagal e o tono da musculatura lisa de vias aéreas (55). A utilização deste anestésico em ratos Wistar Kyoto hipertensos demonstrou visível estabilidade hemodinâmica, resultado de uma grande ação vasodilatadora em vênulas compensada por uma intensa constrição arteriolar, mantendo a estabilidade arterial pressórica na hipertensão (56).

O pentobarbital permite bom estado de analgesia para procedimentos cirúrgicos, sem acarretar grandes repercussões hemodinâmicas. A recuperação pós-anestésica deste agente é lenta (57). Estudos experimentais realizados até meados do ano 2000 apontam ampla utilização deste anestésico em modelos experimentais cirúrgicos. Atualmente, a indisponibilidade comercial desta droga torna inviável sua utilização.

Com relação aos anestésicos inalatórios, uma das vantagens apresentadas é possibilitar ao pesquisador alto grau de controle sobre a profundidade da anestesia além de induzir respostas rápidas tanto na indução como na recuperação anestésica (2). Quando conectados a vaporizadores calibrados é possível conhecer a dose precisa do anestésico administrado (58).

O anestésico inalatório isoflurano induz resposta hiperdinâmica, como taquicardia e hipertensão, além de elevação nos níveis de catecolaminas plasmáticas. Estudo clínico de Tanaka et al. (59) demonstrou que a elevação na FC é bastante rápida, sendo observada cerca de um minuto após o aumento na concentração do gás. A explicação para este evento relaciona-se à estimulação química que este agente ocasiona nas vias aéreas, causando aumento na pressão sanguínea e na atividade nervosa eferente simpática (59).

O isoflurano, por induzir resposta hiperdinâmica ao invés de depressora (59), é visto como um bom agente anestésicos para procedimentos cirúrgicos de longa duração. Além disso, alguns trabalhos na literatura apontam os efeitos benéficos deste anestésico em situações diversas, como regulação das tensões vasculares dos pulmões (60) e proteção destes órgãos dos efeitos nocivos da isquemia-reperfusão pulmonar (61, 62).

O sucesso do controle anestésico pode estar na monitorização hemodinâmica adequada (1). A mensuração direta da pressão sanguínea através da canulação de uma artéria de grande calibre, utilizando cateteres preenchidos com soluções heparinizadas, é a maneira mais antiga e mais utilizada para mensuração da PA direta. Esta técnica é bastante precisa, pois permite calibrações a qualquer tempo, evitando erros de

parâmetros basais ou alterações da sensibilidade ao longo do período de monitorização (63).

Além da escolha do anestésico adequado para cada experimento, o controle térmico dos animais é importante, particularmente em situações experimentais que envolvam tempos anestésicos prolongados. O suporte cirúrgico para o rato deve ser cuidadoso uma vez que são animais com alta taxa metabólica e que perdem calor rapidamente (13). A hipotermia é comum em animais pequenos devido à alta relação volume corporal e área de superfície (64) e pode levar à morte ou a um aumento do período de recuperação da anestesia (2, 25).

Outro ponto de relevância relacionado aos procedimentos envolvendo anestésicos é a tolerância à hemorragia. Animais com maiores taxas metabólicas são menos tolerantes às perdas sanguíneas (25).

1.9. Cirurgia torácica, inflamação e lesão pulmonar

É sabido que toda forma de cirurgia pulmonar resulta em uma inflamação pulmonar aguda (65). A resposta inflamatória é um processo essencial para o indivíduo, tendo seu papel tanto na saúde como na doença (66). A inflamação é uma reação da micro-circulação na qual se observam movimentos de proteínas e leucócitos do sangue para o tecido extravascular (67). Na área inflamada, inicialmente a vasodilatação se soma ao aumento da permeabilidade resultando em perda de fluidos e proteínas plasmáticas para os tecidos. Concomitantemente à perda protéica, ocorre atração celular na medida em que se procede a regulação da expressão de moléculas de adesão e liberação de

fatores quimioatrativos para o local inflamado (Figura 2). Isto facilita a aderência celular para o endotélio vascular e a conseqüente migração das células para a lesão (67).

A especificidade molecular dos leucócitos para seu alvo nos locais de inflamação é mediada por selectinas, integrinas e pela superfamília de genes da imunoglobulina (com destaque para ICAM – molécula de adesão intercelular e VCAM – molécula de adesão celular vascular) (68, 69). As selectinas são responsáveis pela captura dos leucócitos da corrente sanguínea, os quais irão se aderir à membrana estimulados por citocinas, trombinas e histamina (68). Neste ponto, a ligação das integrinas com ICAM e VCAM estabelece a firme adesão do leucócito à célula endotelial favorecendo a migração trans-endotelial que segue com a liberação do conteúdo lisossomal dos leucócitos – constituído por enzimas proteolíticas, leucotrienos e radicais livres de oxigênio (69).

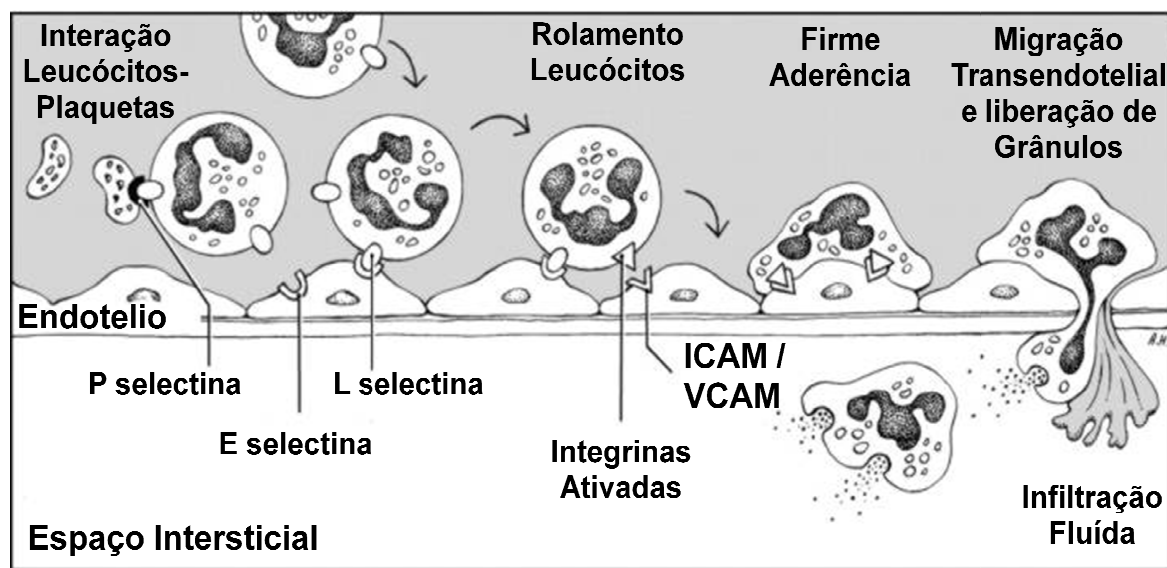


Figura 2: Migração leucocitária. Adaptado de: Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002 Feb; 21(2):232-44.

O processo inflamatório envolve a produção de leucotrienos, prostaglandinas, histamina, bradicinina, fator ativador plaquetário (FAP) e a liberação química de células inflamatórias (70). Nos pulmões, a lesão resultante de uma resposta inflamatória pulmonar envolve quimioatrativos e radicais livres de oxigênio que promovem a atração neutrofílica resultando em uma ampla lesão nestes órgãos (71), considerando que o parênquima pulmonar é uma das maiores reservas de neutrófilos (72).

Os neutrófilos são uma grande fonte de radicais livres de oxigênio, podendo ser considerados as maiores células envolvidas no dano tecidual, com papel de destaque tanto em eventos regionais como em sistêmicos (41). Estas células apresentam enzimas hidrolíticas e proteínas bactericidas armazenadas em seus grânulos citoplasmáticos – azurófilos – as quais são liberadas mediante elevação do nível de cálcio no citoplasma (73).

Os grânulos azurófilos dos neutrófilos apresentam níveis elevados de mieloperoxidase (MPO) que juntamente com a NADPH (nicotinamida adenina dinucleotídeo-P) oxidase de membrana participa da geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) e oxidação de biomoléculas. A MPO derivada dos neutrófilos aumenta o estado citotóxico e contribui para a resposta inflamatória (74). Esta enzima utiliza o peróxido de hidrogênio para oxidar o íon cloreto a ácido hipocloroso (73).

A atividade da MPO pode ser utilizada como um indicador da presença dos neutrófilos, os quais produzem espécies derivadas do metabolismo do oxigênio durante sua ativação (75) à medida que proporcionam defesa rápida contra agentes infecciosos presentes nestes locais (76).

As espécies reativas produzidas pelas células de defesa são instáveis do ponto de vista químico, comportando-se ora como oxidantes (doadores de elétrons), ora como redutores (receptores de elétrons) (75). Entre as ERO destacam-se: superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxil e entre as espécies reativas de nitrogênio (ERN): o óxido nítrico e seus derivados como dióxido de nitrogênio e peróxido nítrico (77).

As ERO atingem todos os componentes celulares, sendo a membrana das células o alvo mais atingido. Isso ocorre devido à interação das ERO com os lipídios das membranas – peroxidação lipídica – acarretando alterações estruturais e de permeabilidade nestas células (75, 78). Ao aumentar a permeabilidade endotelial, as ERO facilitam a transmigração de leucócitos. Pode-se considerar que o elemento fundamental para a disfunção microvascular seja resultado da interação da célula endotelial com leucócitos polimorfonucleares e plaquetas (79).

As alterações vasculares são o pivô inicial da inflamação (66). Na cirurgia torácica a reação inflamatória aguda é fruto de alterações vasculares inerentes ao procedimento operatório e resultam em perda da integridade endotelial. O estresse oxidativo, alterações no balanço de citocinas pró e antiinflamatórias, lesão isquemia-reperfusão, uso de ventilação mono-pulmonar e o procedimento cirúrgico por si são os elementos destacados que levam a esta disfunção endotelial (65).

Cirurgias torácicas que se utilizam de ventilação mono-pulmonar são submetidas a fator inflamatório adicional. A ventilação mono-pulmonar é a grande responsável pela geração de radicais livres que ocorre no momento da reexpansão pulmonar, sendo que a seqüência de eventos ocorridos é descrita como síndrome de reexpansão de atelectasia (80). A reexpansão/reperfusão está associada a disfunções microvasculares, dilatação nas arteríolas e a uma série de outros eventos, dos quais se

destacam a infiltração de leucócitos e o extravasamento de proteínas plasmáticas (41) resultando em edema pulmonar característico.

Como mecanismos determinantes de edema, Lee & Mattahay (81) destacam a pressão vascular pulmonar, a permeabilidade epitelial e endotelial pulmonar às proteínas além da capacidade do epitélio alveolar efetivamente remover os fluidos do edema formado. O edema pulmonar seguido das ressecções pulmonares representa uma causa da SDRA, complicando 4 a 7% das pneumectomia e 1 a 7% das lobectomias (65, 82). Este edema já recebeu diversas denominações, entre elas, edema pós-perfusão pulmonar, edema pulmonar não-cardiogênico e edema pulmonar pós-pneumectomia (36).

A mortalidade associada à LPA caracterizada por edema pulmonar de alta permeabilidade excede 50% (83). Moloney et al. (84) acreditam que tanto a LPA como a SDRA contribuam para mais de 70% das mortes posteriores à lobectomias.

A lesão resultante da isquemia-reperfusão é uma das causas desencadeante de edema e é sabida sua ocorrência após rápida reexpansão de pulmão colapsado ou após transplante pulmonar (82). Saito et al. (85) acreditam que a produção endógena de ERO seja a grande responsável pelo edema pulmonar de reexpansão. No fluido deste edema são encontrados níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (86) e proteínas, sugerindo aumento da permeabilidade e lesão do endotélio (36).

Bianchi et al. (87) afirmam que é estimado que complicações pulmonares sejam responsáveis por 24% dos óbitos que ocorrem no período de seis dias após a cirurgia torácica. A exata incidência destas complicações depende do tipo de cirurgia, do estado de saúde e da função pulmonar do paciente no pré-operatório, porém valores em torno de 50% são mencionados (83).

Os efeitos inflamatórios decorrentes da abordagem cirúrgica do tórax podem ser quantificáveis através da análise dos mediadores inflamatórios (41) que possuem importante papel na patogênese da SDRA – considerada o primeiro determinante de mortalidade em condições de FMSO. A SDRA é caracterizada por uma resposta inflamatória local e a gravidade com a qual se manifesta é determinada pela magnitude da resultante resposta inflamatória sistêmica (88).

1.10. Mediadores inflamatórios

A lesão inicial acarreta uma resposta inflamatória local proporcional à severidade da agressão. Esta resposta inflamatória pode tornar-se sistêmica em diferentes graus de intensidade produzindo uma variedade de mediadores com papel determinante na gravidade, duração e recuperação da doença. A este respeito, níveis alterados de alguns mediadores estão associados ao desenvolvimento de falência de órgãos e morte (89).

Como mediadores inflamatórios da SDRA, podem ser destacados as citocinas TNF- α , IL-1 β (Interleucina-1 β), IL-6, IL-10 (Interleucina-10) (79), além do FAP, da Fração do Complemento 5a (C5a), das ERO, das ERN, dentre outros (88).

As citocinas são peptídeos de pequeno peso molecular sintetizadas e liberadas por muitas células incluindo neutrófilos e monócitos/macrófagos, além de células do epitélio e endotélio pulmonar (83) em resposta a infecção ou lesão tecidual (90). Estas citocinas têm a função de sinalizar o reparo tissular, porém muitas vezes agem como amplificadores da inflamação atraindo mais macrófagos, neutrófilos e mastócitos (91, 92).

Fisiologicamente elas agem em uma distância muito curta, ao contrário dos mensageiros hormonais clássicos (83). Devido a sua conseqüência fisiológica, as citocinas são geralmente classificadas como pró ou antiinflamatórias, embora em alguns casos esta categorização seja insuficiente uma vez que muitas citocinas possuem ambos efeitos (89). Ao se ligarem a receptores específicos de células-alvo, as citocinas iniciam a cascata celular do segundo mensageiro levando à alteração do estado da célula, sendo que os efeitos das citocinas *in vivo* variam dependente do tempo e local de liberação (93).

O polimorfismo genético é parcialmente responsável pelas variações individuais nos níveis de citocinas na saúde e na doença. Alguns estudos fornecem uma compreensão do por que pacientes com insultos semelhantes têm resultados diferentes (89, 94).

Situações de trauma ou doença crítica podem algumas vezes apresentar níveis de citocinas pouco ou até mesmo indetectáveis (89). Isto é em parte atribuível a uma compartimentação da resposta inflamatória. Muitas células que podem produzir grandes quantidades de citocinas estão confinadas aos compartimentos (por exemplo, estroma, células dendríticas, células epiteliais etc.). Nestes compartimentos, a produção local de citocinas pode criar uma lesão final no órgão independente da resposta sistêmica (93). Além disso, devido ao fato das citocinas apresentarem meia-vida curta *in vivo* e biodisponibilidade variável, especula-se que níveis de citocinas sistêmicas podem não corresponder temporalmente ao estado da resposta inflamatória (89).

O TNF- α é um importante mediador devido a sua função reguladora em várias respostas biológicas incluindo inflamação, proliferação, diferenciação e morte celular (95). Promove a liberação de uma multiplicidade de citocinas, eicosanóides, glicocorticóides, e moléculas de adesão (89). Possui meia-vida *in vivo* inferior a 20 minutos o que dificulta a

sua detecção (89, 93). Os efeitos biológicos pleiotrópicos do TNF- α podem ser atribuídos a sua habilidade de simultaneamente ativar muitas vias de sinalização celular (95).

A IL-1 β desencadeia alterações metabólicas e fisiológicas similares às do TNF- α (96). Entretanto, não induz lesão de tecido ou apoptose celular embora possa potencializar os efeitos danosos do TNF- α (90). O tempo de meia vida desta citocina é de aproximadamente 6 minutos (96),

Tanto IL-1 como TNF- α são produzidas principalmente por fagócitos mononucleares e células *natural killer*. No pulmão são principalmente produzidas por células alveolares e intersticiais ativas (principalmente macrófagos), assim como por células endoteliais, sendo atuantes no estágio inicial da LPA (79). Estão presentes no lavado broncoalveolar de pacientes com risco de SDRA como também de pacientes com SDRA estabilizada (88).

A IL-6 é outra citocina que se destaca na SDRA. Como ações pró-inflamatórias mediadas por esta citocina são citadas: produção de imunoglobulinas, indução de fator tecidual, ativação de neutrófilos, proliferação e diferenciação das células T, melhora da atividade da célula *natural-killer* e maturação dos megacariócitos (89). A IL-6 age em muitas células de vários sistemas, sendo uma grande contribuinte da iniciação e extensão do processo inflamatório (97). Esta citocina é encontrada em níveis elevados na maioria dos pacientes com sepse, sendo a quantidade detectada diretamente proporcional a severidade e pior prognóstico da doença (93). Os níveis séricos elevados observados em situações de trauma e doença crítica, ao contrário de outras citocinas, podem ocorrer, em parte, devido ao fato de a IL-6 ter um tempo maior de sua meia vida, além do que os níveis de IL-6 são menos dependentes da função renal (89). Após a lesão, a detecção sistêmica de IL-6 ocorre em 60 minutos, com pico entre 4 e

6 horas, caindo rapidamente em três dias, apresentando efeito rebote diante de evento secundário (93). Além de seu papel na inflamação, a IL-6 tem sido relacionada à modulação da angiogênese e, usualmente, esta interleucina está ausente no pulmão em circunstâncias normais (98).

Em relação às citocinas com função antiinflamatória, a IL-10 se destaca no controle da severidade e duração da resposta inflamatória. Em muitos casos, age como uma espécie de ferramenta clínica para o controle de várias doenças, impedindo a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12 (Interleucina 12) (99). É produzida por macrófagos e por células do tipo monócito em resposta as citocinas Th1 pró-inflamatórias. A produção de IL-10 constitui um *feedback* negativo à produção de TNF- α (100).

Diante da complexidade da resposta inflamatória, da multiplicidade de procedimentos envolvidos nas intervenções torácicas e dos efeitos cumulativos muitas vezes deletérios ao doente, o efetivo controle da resposta inflamatória aguda no pós-operatório representa um desafio a toda equipe envolvida na assistência, tanto no que se refere à busca de medidas profiláticas como alternativas terapêuticas.

Visando elucidar questões científicas comuns na prática clínica inviabilizada em seres humanos por questões éticas específicas, o estudo experimental surge como um ramo da pesquisa que permite uma análise confiável do processo inflamatório.

Contudo, os modelos experimentais em animais de pequeno porte estão padronizados para procedimentos de curta duração. Sendo assim, fazem-se necessárias adaptações aos modelos existentes para estudos que envolvam tempos operatórios prolongados.

O passo inicial para investigarmos as respostas inflamatórias resultantes de intervenções torácicas específicas é a padronização de um modelo experimental com a maior aproximação possível à condição clínica.

2. OBJETIVOS

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

- Padronizar um modelo experimental de estudo da inflamação em cirurgia torácica em ratos através de uma aproximação ao modelo humano, respeitando os aspectos éticos necessários à pesquisa com animais de laboratório.

2.2. Objetivos específicos

- Comprovar a eficácia deste modelo aplicável a cirurgias de longa duração.
- Avaliar a intensidade da resposta inflamatória pulmonar e sistêmica pós-operatória imediata considerando edema e componentes humoral e celular.

3. MATERIAL E MÉTODO

3. Material e Método

O experimento foi realizado no Laboratório de Pesquisa em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.

3.1. Animais de experimentação

Foram utilizados 25 ratos machos Wistar fornecidos pelo Biotério Central da Unicamp, com peso entre 305 e 455 gramas.

Os experimentos foram realizados de acordo com os “Princípios Éticos na Experimentação” da União Internacional Protetora dos Animais e da Lei 6638, de maio de 1979, sendo previamente submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Experimental Animal CEEA-IB-Unicamp (Nº. do protocolo: 1609-1, Anexo 1).

3.1.1. Grupos experimentais

Os ratos foram aleatoriamente divididos em dois grupos: GRUPO EXPERIMENTAL (GE), e GRUPO CONTROLE (GC),

Os animais do GE (n=13) foram submetidos ao protocolo cirúrgico que será descrito detalhadamente a seguir (item 3.2).

Como única intervenção, os animais do GC (n=12) foram induzidos ao plano anestésico com isoflurano a 5% para administração de albumina marcada com iodo radioativo através da veia peniana. Após este procedimento, foi interrompida a administração do anestésico volátil e os animais foram devolvidos às suas gaiolas. Depois

de três horas, os ratos foram novamente anestesiados com isoflurano e sacrificados por exsanguinação.

3.1.2. Adaptação do ventilador mecânico

Diante da FR elevada do rato, optou-se pela adaptação do ventilador Inter 3 Neonatal (Intermed®, SP, Brasil) para uso nos animais do GE. A escolha deste aparelho considerou a excelente adaptação que ele permite ao uso do vaporizador calibrado para isoflurano (Vaporizador Marcovap IS 707, fabricado pela Narcosul Aparelhos Científicos LTDA - Porto Alegre, RS, Brasil) não representando um obstáculo para utilização de anestésico inalatório. Este ventilador possibilitou ainda a administração de baixo fluxo aéreo, FR alta (80 rpm), valores precisos de Pressão Inspiratória (PI) e PEEP, ajuste da FiO_2 além da segurança dos alarmes pressóricos resultantes da interação ventilador/animal. O umidificador do ventilador também foi utilizado para garantir o aquecimento dos gases administrados, prevenindo a formação de rolhas de secreção traqueal.

3.1.3. Parâmetros de ajuste do ventilador mecânico

Os parâmetros de ajuste ventilatório iniciais deste protocolo cirúrgico foram: 20 cmH_2O para PI, 2 cmH_2O para PEEP, FiO_2 de 60%, FR de 80 rpm e relação inspiração/expiração (I:E) de 1:3. Estes valores foram obtidos a partir de estudos-piloto acompanhados de coletas gasométricas em simulações ventilatórias diversas, baseadas em dados da literatura e interpretadas de acordo com os achados do sangue arterial.

3.2. Descrição do procedimento operatório

Todos os animais do GE foram induzidos ao plano anestésico com isoflurano a 5%. Após obtenção do plano anestésico adequado (verificado através da ausência de resposta aos reflexos palpebral, caudal e plantar) foi iniciado o protocolo cirúrgico.

Inicialmente, os animais foram colocados em decúbito dorsal em manta térmica aquecida e tricotomizados nas regiões cervical, torácica e inguinal esquerda.

Em seguida foram traqueostomizados (42) com a introdução de um cateter (fixo com sutura de algodão 2-0) através de incisão mediana no pescoço (Figura 3). Imediatamente após, iniciou-se a VM em respirador controlado a pressão, sendo os parâmetros de ajuste previamente descritos.

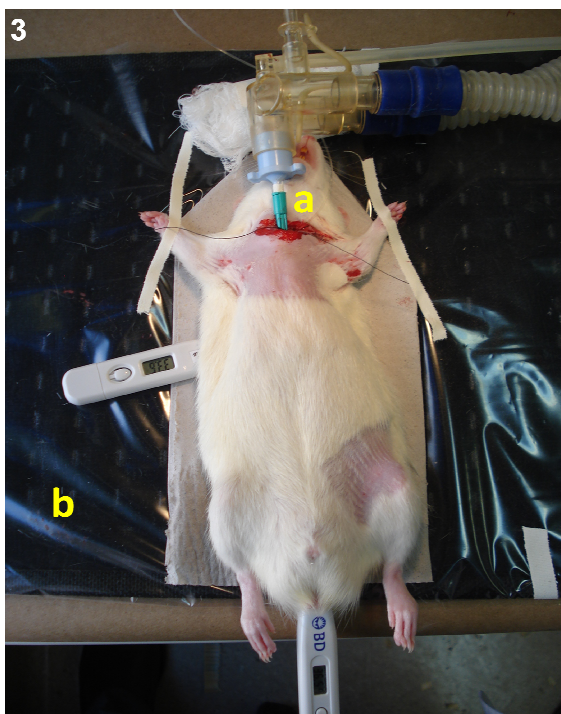


Figura 3: Início do protocolo cirúrgico. Animal anestesiado, traqueostomizado (a), em VM, sobre manta térmica (b).

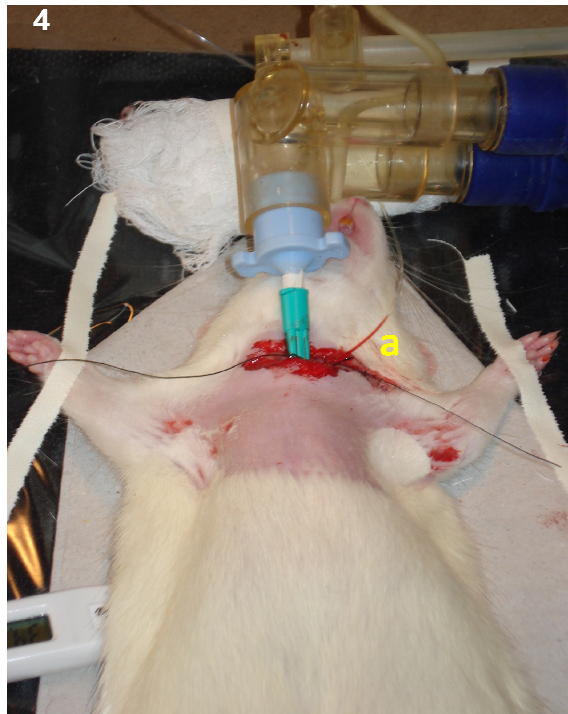


Figura 4: Canulação da artéria carótida esquerda (a) para controle pressórico e coleta gasométrica.

Após conexão do animal ao ventilador, fez-se necessário acompanhar visualmente a expansão do tórax para verificar simetria na ventilação evitando-se erros de intubação seletiva ou de qualquer outra natureza. Neste momento, a concentração de isoflurano foi diminuída até 1.5% para manutenção do plano anestésico (13) e os reflexos do animal foram novamente testados nesta etapa.

Em seguida, a veia femoral esquerda foi dissecada e utilizada para administração de solução salina 0,9% para reposição hídrica (1 mL / h). Esta mesma veia serviu para administração do bloqueador neuromuscular (brometo de pancurônio) *in bolus* (1mg / kg.h) aplicado a todos os animais do protocolo cirúrgico, que ficaram totalmente entregues a VM, sem a presença de movimentos ventilatórios voluntários.

A artéria carótida esquerda foi canulada e mantida com solução salina heparinizada (5UI/ml) para monitorização de PAM (Pressão Arterial Média) (Figura 4) através do aparelho Mac Lab/400 e Software PowerLab® (ADInstruments, NSW, Austrália). Logo após a canulação desta artéria foi colhida uma amostra de sangue arterial para análise gasométrica em seringa heparinizada da marca Radiometer® (Copenhagen, Dinamarca) (Figura 5).

O sangue arterial coletado foi imediatamente analisado em gasômetro ABL 555 (Radiometer®, Copenhagen, Dinamarca). Estando os valores de pH na faixa de 7,35 a 7,45 dava-se continuidade ao protocolo cirúrgico. Caso contrário, realizava-se a alteração exclusiva do parâmetro PI do ventilador mecânico conforme necessidade a partir da interpretação do resultado gasométrico e, após um período aproximado de 20 minutos, coletava-se nova gasometria.



Figura 5: Coleta gasométrica.

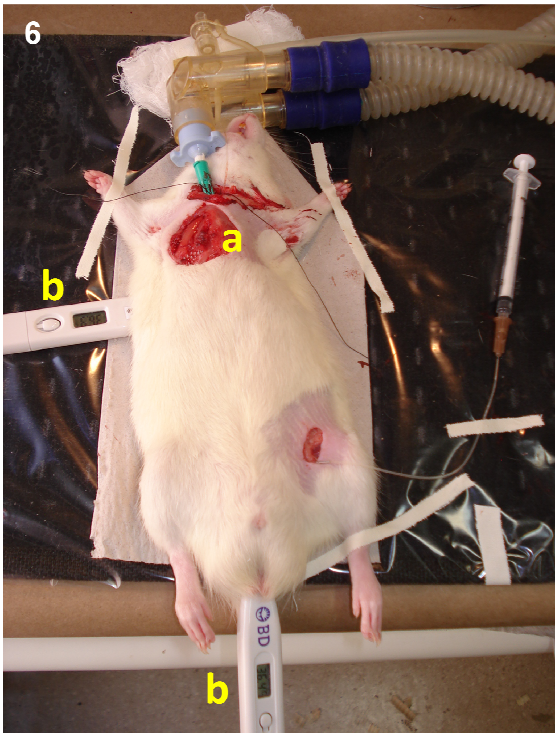


Figura 6: Procedimento cirúrgico – toracotomia para-esternal direita (a). Temperatura corpórea controlada (b).

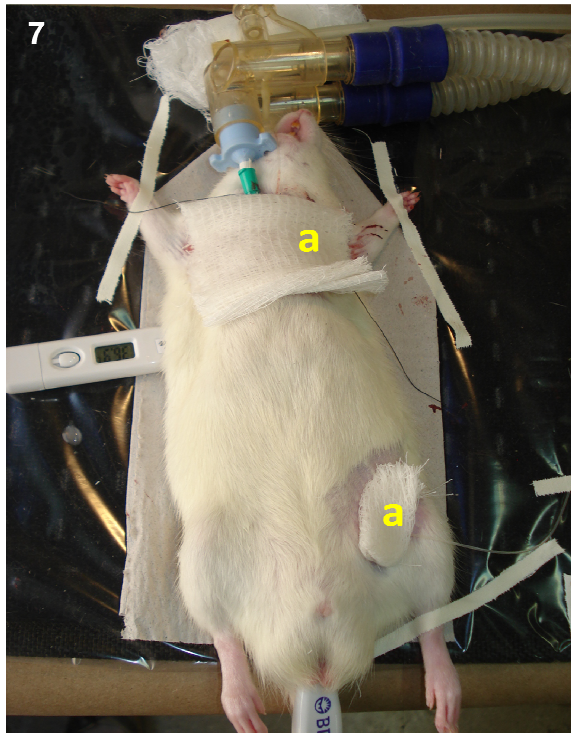


Figura 7: Incisões cobertas para minimizar perdas evaporativas (a).

Apenas diante de valor satisfatório dos gases sanguíneos, foi realizada toracotomia para-esternal direita, com ampliação antero-lateral homolateral, simulando uma exploração cirúrgica necessária para a observação das reações hemodinâmicas do animal diante de procedimentos manipulativos no tórax (Figura 6). Após a abertura torácica, as incisões foram cobertas com gaze úmida de solução salina para minimizar perdas evaporativas (Figura 7).

Neste momento, foi injetada albumina marcada com iodo radioativo através da veia femoral para posterior avaliação do extravasamento de proteínas séricas.

Com o tórax aberto, os animais permaneceram em VM por três horas sendo checados a cada quinze minutos os valores de PAM e temperaturas retal e dorsal que foram mantidas na faixa de 35,9 e 37,5°C (2).

No instante final da VM, antes do sacrifício do animal, nova coleta de sangue arterial para análise gasométrica foi realizada. Ao final do experimento, os ratos receberam dose aumentada de isoflurano (5%) para realização de laparotomia mediana e coleta de sangue da aorta abdominal. Os animais foram sacrificados por exsanguinação e o sangue coletado foi em seguida processado e o soro obtido utilizado para análise das citocinas.

O bloco coração/pulmão foi removido após preparo prévio exigido para as medidas da atividade da MPO. Para isso, os pulmões foram perfundidos com 40 ml de solução salina 0,9% heparinizada (5 UI / mL) a partir de uma altura de 20cm através da artéria pulmonar, seguida de abertura de átrio esquerdo para drenagem do efluente.

Como último procedimento, foi realizado o isolamento cuidadoso dos lobos pulmonares em placa de petri, com armazenamento subsequente das amostras de tecido a temperatura de -80°C.

Embora com protocolos de intervenção totalmente distintos, o sacrifício e os procedimentos necessários ao armazenamento das amostras de tecido pulmonar e soro dos animais do GC foram idênticos aos do GE.

3.3. Padronização das amostras para análise inflamatória

As amostras de tecido pulmonar foram cuidadosamente analisadas seguindo a representação esquemática da figura 8.

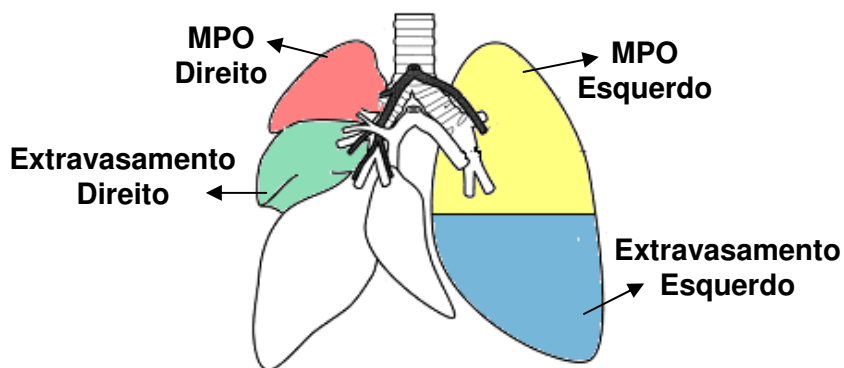


Figura 8: Representação esquemática dos segmentos pulmonares do rato para padronização das amostras. As setas apontam a análise realizada: para o pulmão direito foram considerados os lobos isolados; o pulmão esquerdo, por não ser lobulado, foi cuidadosamente seccionado. Adaptado de: Nawaka S, Abolhoda A, Ross HM, Brooks A, Burt ME. Sequential bilateral isolated lung perfusion in the rat: an experimental model. *Ann Thorac Surg* 1997; p.797.

3.4. Análises inflamatórias

3.4.1. Extravasamento de proteínas séricas e relação peso pulmonar úmido/seco

A quantidade de edema pulmonar foi avaliada em função do acúmulo local de albumina humana marcada com ^{125}I ($2,5\mu\text{Ci/kg}$) (101), que foi administrada via endovenosa após a abertura torácica nos animais do GE e, pela mesma via, nos animais do GC após anestesia.

A determinação do extravasamento de proteínas séricas foi obtida em função da radioatividade presente nas amostras de sangue e tecido pulmonar, quantificadas em contador γ . O edema formado foi expresso como volume de soro extravasado no tecido pulmonar em função da contagem obtida em 1mL de soro, e os valores finais apresentados em $\mu\text{L/g}$.

Para obtenção da relação peso pulmonar úmido/seco os pulmões foram pesados, em seguida aquecidos em estufa a 90°C por 24 horas, sendo o peso novamente aferido.

3.4.2. Determinação da atividade de MPO

Cada amostra de tecido pulmonar foi homogeneizada durante 15 segundos e alíquotas de 1ml do homogenato foram centrifugadas por 2 minutos em velocidade máxima em centrífuga de Eppendorf. Os sobrenadantes obtidos foram submetidos à análise da atividade da MPO.

Em uma placa de ELISA, 5µl de sobrenadante foram adicionados a 200µl de solução de dihidroclorato de o-dianisidina (0,167mg/ml preparada em tampão fosfato de potássio 50mM contendo 0,005% de H₂O₂). As alterações nos valores de absorbância a 460nm foram registradas em intervalos de 15 segundos durante 10 minutos. A atividade da MPO foi expressa como unidades de MPO (UMPO)/mg de tecido pulmonar. Uma UMPO foi definida como a quantidade de enzima que degrada 1µmol de peróxido/min à 25°C (102).

3.4.3. Determinação de citocinas séricas

As concentrações de IL-10, IL-6, IL-1β, e TNF-α foram determinadas no soro de todos os animais através de *kits* industrializados, segundo as instruções do fabricante (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). O método laboratorial utilizado foi ELISA, ensaio imunoenzimático quantitativo do tipo sanduíche: reação anticorpo-antígeno-anticorpo conjugado.

3.5. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software Stata 9.2. Todas as variáveis foram testadas para distribuição normal usando Shapiro-Wilks W-test. Quando normalmente distribuídos (dados paramétricos), os dados foram apresentados como média ± erro padrão da média (EPM), aplicando-se teste t de Student. Variáveis não-normalmente distribuídas (dados não-paramétricos) foram analisadas utilizando-se teste de Mann-Whitney, sendo apresentadas como mediana e intervalo interquartil (p 25-75). Para comparação intra-grupo de variáveis não-paramétricas (UMPO, extravasamento de proteínas séricas, pH, PaCO₂, PaO₂, BE e SO₂) foi empregado teste de Wilcoxon. As

diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para todas as análises quando valor de $p < 0.05$.

4. RESULTADOS

4. Resultados

4.1. Extravasamento de proteínas séricas

Foram observadas diferenças significativas com relação ao extravasamento de proteínas séricas medidos nos pulmões direito ($p=0.014$) e esquerdo ($p= 0.039$) quando comparados os grupos CONTROLE e EXPERIMENTAL, sendo encontrados valores menores no grupo submetido ao protocolo cirúrgico (Gráfico 1 e Tabela 1).

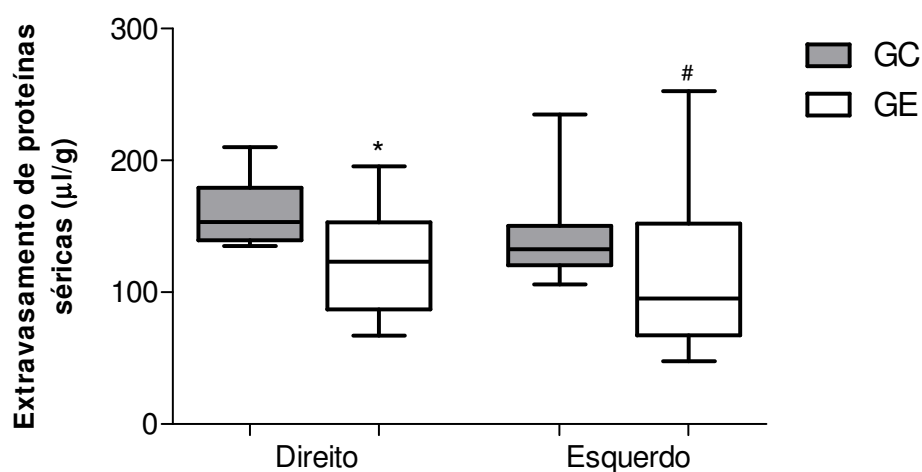


Gráfico 1: Extravasamento de proteínas séricas pulmonares nos pulmões direito e esquerdo dos ratos controle (GC) e operados (GE). Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil (p 25-75) para GC (n=12) e GE (n=13). * $p=0.014$ e # $p= 0.039$ (Mann-Whitney test P) comparados em relação ao GC.

Na análise intra-grupo para comparação da quantidade de extravasamento plasmático entre os pulmões direito e esquerdo, foi constatada inexistência de diferença significativa entre os valores encontrados no GE ($p=0.196$). No GC observamos valores

de extravasamento aumentados no lado direito ($p= 0.041$), sendo as análises realizadas pelo teste de Wilcoxon.

Tabela 1. Valores de extravasamento de proteínas séricas e UMPO

| | Grupo Controle | | | Grupo Experimental | | |
|--|----------------|---------------|---------------|--------------------|---------------|---------------|
| | Mediana | Percentil 25% | Percentil 75% | Mediana | Percentil 25% | Percentil 75% |
| Extravasamento pulmão direito ($\mu\text{l/g}$) | 153.47 | 140.58 | 178.84 | 123.19 | 91.18 | 150.59 |
| Extravasamento pulmão esquerdo ($\mu\text{l/g}$) | 132.58 | 120.98 | 145.62 | 95.45 | 69.84 | 121.43 |
| UMPO direito | 7.35 | 2.75 | 41.77 | 16.5 | 11 | 23.9 |
| UMPO esquerdo | 11.6 | 4.65 | 32.56 | 15.2 | 11.1 | 23.7 |

Dados não-paramétricos apresentados como mediana e intervalo quartil (p 25 – 75).

4.2. Relação peso pulmonar úmido/seco

A relação peso úmido/seco do pulmão direito apresentou valor médio de 5.42 ± 0.142 para o GC e de 5.77 ± 0.186 para o GE, não diferentes estatisticamente. Para o pulmão esquerdo, os valores obtidos foram de 5.96 ± 0.196 no GC e de 5.97 ± 0.179 no GE, novamente sem diferenças significativas.

4.3. Recrutamento neutrofílico: expressão de MPO no tecido pulmonar

Os valores da atividade da enzima MPO, indicativo de recrutamento de neutrófilos nos pulmões, não diferiram estatisticamente entre os grupos (Tabela 1 e Gráfico 2).

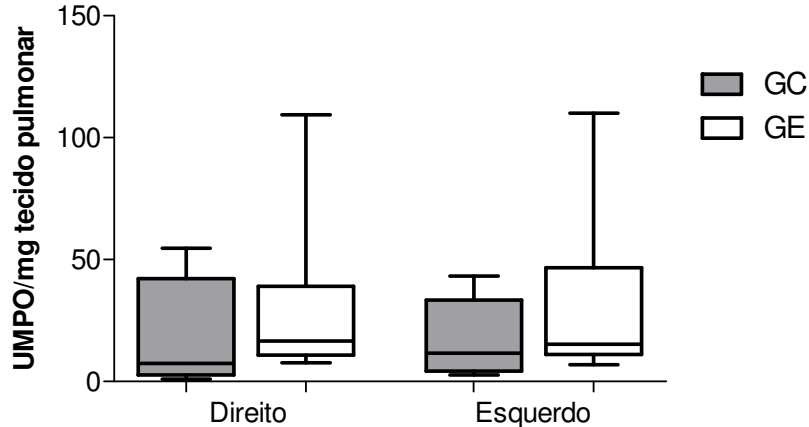


Gráfico 2: Medidas da atividade de MPO no tecido pulmonar direito e esquerdo dos ratos controle (GC) e operados (GE). Não houve diferença significativa entre os grupos (Mann-Whitney test P) tanto no pulmão direito ($p=0.092$) como no esquerdo ($p=0.211$).

Esta inexistência de diferença significativa também ocorreu na análise intra-grupo quando comparados os valores de UMPO medidos nos pulmões direito e esquerdo, sendo $p=1$ no GC e $p=0.807$ no GE utilizando teste de Wilcoxon.

4.4. Marcadores da inflamação sistêmica

As citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-10 e não foram detectáveis no soro dos animais dos dois grupos do estudo, sendo que as medidas ficaram abaixo do menor ponto da curva-padrão (62.5 pg / mL) utilizada nos kits.

Já a citocina IL-6 foi quantificada apenas no GE, apresentando valor médio de 1.11 ± 0.5 ng / mL.

4.5. Comportamento gasométrico

O comportamento gasométrico inicial e final neste protocolo não diferiu significativamente em nenhum dos parâmetros analisados (pH, PaO₂, PaCO₂, HCO₃⁻, BE e SO₂), como apresentado na Tabela 2, sendo valores de $p>0.05$.

Tabela 2: Valores gasométricos iniciais e finais dos animais operados

| | Inicial | | | Final | | |
|--|---------|---------------|---------------|---------|---------------|---------------|
| | Mediana | Percentil 25% | Percentil 75% | Mediana | Percentil 25% | Percentil 75% |
| pH | 7.39 | 7.36 | 7.48 | 7.37 | 7.28 | 7.48 |
| PaO ₂ (mmHg) | 211.8 | 204.4 | 228.7 | 214.7 | 169.1 | 227.3 |
| PaCO ₂ (mmHg) | 41.2 | 33 | 47 | 36.7 | 26.6 | 57 |
| HCO ₃ ⁻ (mmol/L) | 25.2 | 24.4 | 26.1 | 21.3 | 19.7 | 25.7 |
| BE (mmol/L) | 0.2 | -0.7 | 1.9 | -1.9 | -4.1 | -1.7 |
| SO ₂ (%) | 99.6 | 99.6 | 99.7 | 99.6 | 99.1 | 99.6 |

Dados apresentados como mediana e intervalo interquartil (p 25 – 75).

4.6. Comportamento hemodinâmico

Com relação à PAM, o grupo de animais operados apresentou 114 mmHg como valor médio ao longo de todo o protocolo experimental, sendo que variação média entre a máxima e a mínima PAM registradas foi de 38.6 mmHg. Ademais, nenhum animal apresentou instabilidade hemodinâmica durante o protocolo cirúrgico, e todos completaram o protocolo experimental.

5. DISCUSSÃO

5. Discussão

Os procedimentos cirúrgicos experimentais estão amplamente padronizados para técnicas anestésicas de curta duração. Não encontramos na literatura nacional modelos experimentais com ratos que descrevam técnicas bem sucedidas de manutenção anestésica e intervenção cirúrgica para procedimentos prolongados garantindo adequada estabilidade hemodinâmica ao animal.

As pesquisas em nosso meio descrevem estudos experimentais com animais de pequeno porte utilizando períodos prolongados de ventilação (103) não associados a procedimentos cirúrgicos. Incorporar a manutenção anestésica, o suporte ventilatório invasivo, procedimento manipulativo torácico e tempo operatório prolongado ao controle hemodinâmico e gasométrico possibilitou-nos fundamentar este modelo, que avaliou a magnitude da resposta inflamatória resultante do protocolo operatório obtida através das análises do extravasamento de proteínas séricas, da relação peso pulmonar úmido/seco, da atividade da MPO e dos níveis séricos de citocinas inflamatórias resultantes das intervenções – toracotomia e VM.

O modelo que descrevemos é o resultado mais satisfatório de muitos testes realizados, com adaptação das informações da literatura e transposição da prática clínica à experimentação animal, numa tentativa de reproduzir a condição operatória humana e validá-la para estudo em roedores.

5.1. Modelo experimental

A ética foi um aspecto relevante na elaboração deste protocolo. Por definição, são considerados éticos os experimentos que resultam em benefício direto para a saúde humana e animal, ou que indiretamente contribuam significativamente com conhecimentos adicionais sobre fisiologia e comportamento dos seres vivos (2), significado condizente com os objetivos norteadores desta pesquisa. Foram cumpridas todas as diretrizes que orientam a pesquisa experimental referentes a armazenamento bem como cuidados na manipulação dos animais durante o procedimento experimental

O rato foi escolhido para o modelo, pois sob o aspecto fisiológico este animal apresenta comportamento semelhante ao humano, os custos financeiros para sua aquisição e manutenção em biotério são menores quando comparados a outras espécies, possui alta capacidade reprodutiva com gestação de curta duração (de 20 a 23 dias) e ainda possibilita linhagens geneticamente bem definidas (2, 12). Nos primeiros ensaios já foi possível observar que esta espécie animal se adequou ao protocolo além do que permitiu praticidade na manutenção e na reprodutibilidade dos resultados. Estas características são necessárias a todo modelo experimental.

Em relação à logística, obtivemos êxito na ventilação dos ratos com algumas adaptações realizadas em ventilador mecânico neonatal de produção nacional. Este ventilador, utilizado em humanos, mostrou-se seguro e confiável para o experimento. Metodologicamente, a opção de ventilação controlada à pressão apresentou algumas vantagens quando comparada ao modo volume-controlado, tais como: redução de riscos de barotrauma, melhor homogeneidade de ventilação e relação ventilação/perfusão (V/Q) mais favorável. Outro dado relevante é que, apesar desta modalidade não promover melhora em relação à oxigenação, possibilita picos pressóricos mais baixos (104).

Os parâmetros ventilatórios utilizados nesta pesquisa não seguem nenhum protocolo descrito na literatura internacional. Isto, porque o controle gasométrico revelou significativa acidose respiratória em todas as tentativas realizadas com base nos parâmetros indicados na literatura. Portanto, apoiados em análises gasométricas e valores fisiológicos de referência para ratos, chegamos aos parâmetros de $PI= 20 \text{ cmH}_2\text{O}$, $PEEP= 2 \text{ cmH}_2\text{O}$, $FR= 80 \text{ rpm}$ e $I:E= 1:3$. Estes valores foram considerados adequados para o início do protocolo, sendo o valor de PI readaptado diante da necessidade constatada após a primeira análise gasométrica que objetivou manutenção de pH entre 7,35 e 7,45.

A opção por utilizar a concentração de oxigênio a 60% considerou o risco potencial da toxicidade deste gás. Embora seja pouco provável que a exposição relativamente breve de oxigênio a 100% cause lesões em pulmões normais, existem evidências sugerindo que pacientes cirúrgicos submetidos a procedimentos torácicos podem ser mais suscetíveis à toxicidade de oxigênio. Além de reduzir a produção de ERO em um pulmão já mais suscetível a lesões, a menor FiO_2 traz outros benefícios como por exemplo, prevenção de atelectasias resultante da exposição do pulmão a 100% de oxigênio, conhecida como atelectasia de absorção (105).

O agente anestésico isoflurano, por induzir resposta hiperdinâmica (59) ao invés de depressão cardiovascular, foi visto como boa opção para procedimentos cirúrgicos de longa duração. Porém a escolha de um anestésico volátil foi inicialmente questionada, levando-se em consideração sua possível influência no órgão-alvo deste estudo inflamatório. O pulmão, por ser justamente a via de absorção do isoflurano, ficaria exposto à sua ação direta. Contudo, estas considerações foram descartadas após o

conhecimento de pesquisas científicas que revelam o efeito protetor de anestésicos voláteis na lesão pulmonar induzida por isquemia-reperfusão (61, 62).

Outro estudo revelou resultados favoráveis referentes à relação peso pulmonar úmido/seco, atividade da desidrogenase láctica, coeficiente de filtração e metabólitos do óxido nítrico ao investigar os efeitos do isoflurano em pulmão isolado de coelho (62). Apoiado nestas informações excluiu-se a influência negativa do isoflurano na interpretação da resposta inflamatória. A opção pela utilização deste anestésico em nosso modelo decorre ainda das inúmeras tentativas sem sucesso realizadas com outros agentes – uretano, tiopental, associação ketamina e xilasina, que acarretaram morte do animal em torno da primeira hora do experimento.

Para atingir os objetivos deste estudo, não foram realizadas intervenções visando corrigir ou minimizar as alterações impostas pelo modelo *per se*. Após adequação gasométrica inicial, foram cumpridos durante o procedimento a reposição volêmica padrão, o controle termostático e a manutenção da administração anestésica de isoflurano aliado ao bloqueador neuromuscular. Destaca-se que o animal apenas recebeu a primeira dose de pancurônio após controle do plano anestésico, cuidadosamente testado através dos reflexos córneo, caudal e plantar enquanto o animal recebia isoflurano a concentração de 1,5%. Todos os animais apresentaram ausência de resposta a estes reflexos confirmando que o isoflurano nesta concentração foi suficiente para manutenção anestésica adequada para o protocolo operatório.

A monitorização utilizada durante os experimentos mostrou-se suficiente, pois permitiu ao pesquisador a observação do comportamento da PAM imediatamente após cada intervenção realizada. Com relação ao desempenho hemodinâmico, obtivemos resposta bastante similar entre os animais operados, com estabilidade no transcorrer de

todo protocolo. Sabe-se que durante uma cirurgia podem ocorrer variações da PA devido a alterações no sistema nervoso central, cardíacas ou respiratórias, sendo que a anestesia contribui para estas ocorrências (106). Após indução anestésica e intubação, o curso anestésico é tipicamente caracterizado por um período inicial de mínima estimulação que é freqüentemente associado à hipotensão, seguido de períodos de intensa estimulação, como ocorre na incisão da pele e esternotomia, podendo provocar taquicardia e hipertensão (107). Como sugerido por Basan-Mogol et al. (107), agentes anestésicos devem ser usados apropriadamente na antecipação destes eventos. Pela favorável resposta hemodinâmica caracterizada por ausência de oscilações pressóricas do início ao término do experimento, acreditamos que foi alcançada boa adequação no procedimento anestésico-cirúrgico neste modelo.

Sob o aspecto gasométrico, todos os parâmetros analisados não diferiram de modo significativo do início para o final do experimento. Diante da conhecida sensibilidade ao pH de muitas funções enzimáticas e da influência das alterações no *status* ácido-básico sobre os sistemas biológicos (108), o equilíbrio gasométrico observado durante o protocolo operatório confere um achado positivo ao experimento.

Este estudo obteve êxito em relação ao controle biológico, apresentando taxa de mortalidade nula, o que nos permite afirmar que, após vários estudos-piloto, conseguimos desenvolver um modelo biologicamente correto para o estudo da inflamação de procedimentos cirúrgicos pulmonares de longa duração.

5.2. Repercussão inflamatória da técnica cirúrgica

A toracotomia utilizada foi a médio-esternal direita com ampliação lateral ao nível do quinto espaço intercostal. Esta abertura do tórax permitiu ao pesquisador uma ampla visualização da cavidade e órgãos intratorácicos, além do que foi considerada suficiente para provocar as alterações fisiológicas esperadas a partir da exposição da cavidade torácica à pressão atmosférica por prolongado período operatório.

A repercussão inflamatória local resultante desta técnica cirúrgica foi investigada através das medidas do extravasamento de proteínas séricas e da atividade da MPO, que nos apontam respectivamente edema e recrutamento neutrofílico no pulmão, órgão-alvo desta investigação. Sistemicamente, o quadro inflamatório humoral foi quantificado através das análises de citocinas inflamatórias.

O edema é o sinal inicial da inflamação, resultante de um fluxo do compartimento intravascular para o interstício (90). Nossos resultados revelaram valores de extravasamento de proteínas séricas significativamente menores nos pulmões dos animais submetidos ao protocolo operatório em relação aos animais controle. Tais achados estão alicerçados nos conceitos de fisiologia pulmonar e mecânica respiratória. Apenas o GE foi submetido à ventilação artificial com pressão positiva, a qual altera a *performance* cardíaca quando comparada à ventilação espontânea (109). Durante a respiração normal, a fase de pressão negativa na inspiração favorece o retorno venoso, alivia a pressão sobre os capilares pulmonares e estimula o fluxo (110). Ao contrário, na ventilação com pressão positiva, a pressão intratorácica aumenta durante a inspiração causando uma diminuição no retorno venoso, no débito ventricular direito e no fluxo sanguíneo pulmonar. Na expiração, a pressão intratorácica atinge o nível zero e o retorno

venoso aumenta o que pode ser modificado com o emprego da PEEP causando redução do retorno venoso também durante a expiração (110).

Os conceitos mencionados no parágrafo anterior justificam os valores reduzidos de extravasamento de proteínas séricas encontrados neste estudo, sendo que os animais do GE foram submetidos à aplicação de pressão positiva durante todo o ciclo ventilatório. A PEEP foi responsável por aumentar a pressão intersticial e reduzir o gradiente de pressão entre o espaço vascular e intersticial (111). Na prática clínica, a aplicação de pressão positiva é um recurso rotineiramente utilizado uma vez que níveis moderados de PEEP podem conter a formação do edema pulmonar (111,112).

Simultaneamente, a inversão pressórica resultante da exposição da cavidade torácica à pressão atmosférica após a toracotomia influencia a resistência dos vasos extra-alveolares e os de maior calibre próximos ao hilo (113), sendo mais um fator interferente na perfusão pulmonar no grupo de animais operados.

Sendo assim, tanto a inversão pressórica observada na cavidade torácica como a aplicação de pressão positiva durante todo o ciclo respiratório configuram fatores que justificam os valores reduzidos no extravasamento de proteínas séricas no GE comparado ao GC. Se neste modelo houvesse liberação de citocinas e outras substâncias da cascata inflamatória que lesam as células endoteliais permitindo o aumento da permeabilidade na membrana endotelial vascular (109, 114), seria observado edema no GE. A não detecção de citocinas inflamatórias neste estudo é mais um fator que sustenta a ausência de edema pulmonar no grupo operado.

Ainda na quantificação do edema, os valores da relação peso pulmonar úmido/seco não diferiram significativamente entre os grupos de estudo, diferentemente do

observado em relação ao extravasamento de proteínas séricas mensurado com material radioativo. A menor sensibilidade da avaliação gravimétrica (peso úmido/seco) pode explicar este achado.

Concomitantemente a formação de edema e perda protéica, ocorre atração celular ao mesmo tempo em que se procede a regulação da expressão de moléculas de adesão e liberação de fatores quimioatrativos para o local inflamado (67). Os neutrófilos são as células que se direcionam precocemente ao dano tecidual (68) dirigidos por gradientes quimiotáticos até o local lesado (73). A atividade enzimática da MPO pode ser usada como um indicador da presença dos neutrófilos (75). Neste estudo, a MPO não diferiu significativamente entre os grupos, sendo um indicativo de baixa agressividade da técnica cirúrgica e ventilatória demonstrada na mensuração pós-operatória imediata.

Além da resposta inflamatória local, foi investigada a repercussão sistêmica através da análise de mediadores inflamatórios. A proposta foi avaliar as citocinas inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IL-6 – uma vez que há muito se sabe que o trauma cirúrgico causa aumento nos níveis circulatórios sistêmicos destes mediadores (115) – além da IL-10, considerada uma citocina antiinflamatória que garante proteção biológica e reduz a patologia pulmonar (116).

O TNF- α , uma citocina pró-inflamatória de liberação precoce, ativa outras citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β e IL-6 (117). Estes dois mediadores ativam a cascata inflamatória pela produção de outras quimiocinas e pela liberação de moléculas de adesão endoteliais (118). Neste trabalho, os níveis de TNF- α e de IL-1 β não foram detectados no soro dos animais. A partir deste achado, algumas especulações foram levantadas. A primeira hipótese considera que talvez não tenha ocorrido de fato a liberação destas citocinas devido à baixa agressividade do procedimento realizado. A

segunda refere-se à ocorrência de uma possível compartimentação da inflamação (89), que pode justificar a ausência de resposta inflamatória sistêmica na presença de lesão em órgão-alvo. Uma terceira proposição considera o tempo de meia vida curto das citocinas na circulação sistêmica sendo de 20 minutos para o TNF- α e de 6 minutos para a IL-1 β (89, 96).

Neste estudo, a coleta sanguínea para quantificação dos níveis de citocinas sistêmicas foi realizada ao término do experimento, ou seja, após três horas da realização da toracotomia. Devido à inexistência de informações na literatura que assinalem o exato momento de liberação das citocinas em modelo animal, usou-se como parâmetro um estudo clínico que caracteriza a curva de liberação das citocinas inflamatórias (Figura 9) em uma amostra de humanos saudáveis expostos à endotoxina (96).

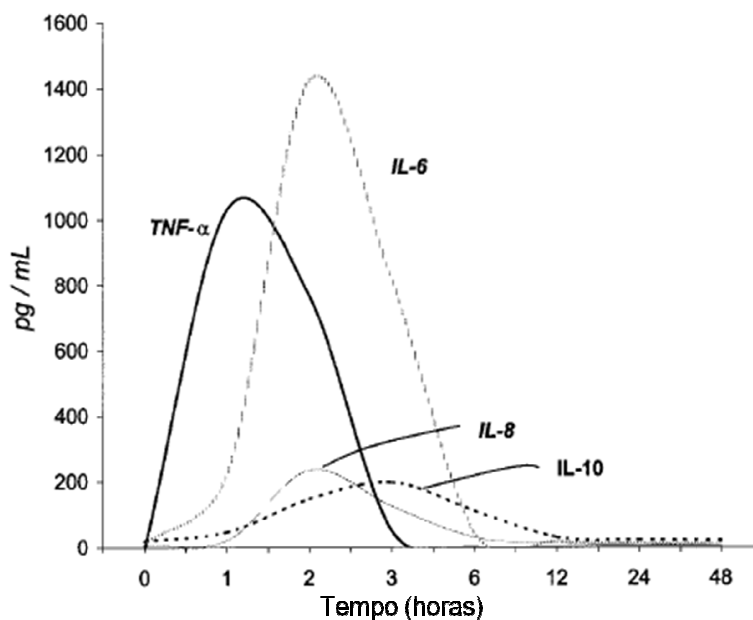


Figura 9: Níveis circulatórios médios de TNF- α , IL-6, IL-8 e IL-10 em relação ao tempo, após administração de endotoxina intravenosa. Modificado de: Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery* 2000 Feb; 127(2):117-26.

Pela curva apresentada por Lin et al. (96), fica evidente que em três horas após a exposição ao insulto é praticamente nula a quantidade de TNF- α na circulação sistêmica. Apesar dos autores não apresentarem graficamente a liberação de IL-1 β , acreditamos que o seu comportamento seja similar ao do TNF- α , uma vez que ambas são consideradas citocinas pró-inflamatórias de liberação precoce e apresentam características fisiológicas bastante semelhantes.

Além disso, é sabido que estratégias prejudiciais de VM aplicadas em pulmões normais podem ser responsáveis pelo recrutamento neutrofílico (35) e aumento nos níveis de citocinas nos pulmões e na circulação sistêmica (119). Os resultados obtidos permitem afirmar que a estratégia ventilatória utilizada não desencadeou liberação destes mediadores, pois neste caso, o fator tempo não influenciaria a quantificação de citocinas resultantes da VM.

Ainda relacionado à não detecção sistêmica de TNF- α , uma última especulação, seria a consideração de que os anestésicos voláteis agem favoravelmente modulando a resposta inflamatória, sendo o efeito protetor relacionado à inibição da liberação desta citocina (61, 62).

Outro mediador investigado neste estudo foi a IL-6, que pode ser utilizada como um preditor da severidade de SDRA de diferentes etiologias (88) como também um indicador do trauma operatório (115). Este estudo detectou níveis séricos de IL-6 apenas nos animais do GE. A curva de liberação desta citocina evidencia pico de liberação após duas horas do insulto inicial, sendo que em três horas, ainda é sistemicamente detectada (96). Uma relevante consideração foi a ausência de correlação entre IL-6 e recrutamento neutrofílico. Apesar da expressão sistêmica, a IL-6 não promoveu atração de neutrófilos

para o tecido pulmonar nos animais do GE o que foi demonstrado através da inexistência de diferença significativa na atividade da MPO entre os grupos do estudo.

Sabe-se que a IL-6 é estimulada tanto na hipóxia – fato verificado na cultura de células endoteliais e também na análise do plasma *in vivo* (120) – como também em resposta a endotoxemia, IL-1 β e TNF- α (88). Não está esclarecido se a IL-6 foi desencadeada por IL-1 β e TNF- α não mais presentes na circulação sanguínea ou por outros mecanismos independentes da ação de mediadores.

Com relação à IL-10, não foi detectado níveis quantificáveis no soro dos animais. Pela sua curva de liberação observa-se que o pico sérico desta citocina ocorre após três horas do insulto inicial, coincidente com o tempo padronizado para coleta sanguínea neste estudo. Considerando a hipótese de que o balanço fisiológico entre citocinas anti e pró-inflamatórias seja determinante na expressão da inflamação (121), interpreta-se que a ausência de determinados mediadores pode justificar a ausência de IL-10 caracterizando a baixa agressividade deste protocolo.

5.3. Considerações finais

A magnitude da resposta inflamatória tem caráter cumulativo e dependente de inúmeros fatores. O conhecimento da expressão isolada de cada fator e medidas preventivas para reduzir a sua intensidade consistem importante ferramenta na prática clínica.

Pretende-se, a partir deste experimento, aprofundar os estudos de resposta inflamatória provenientes de manipulações cirúrgicas torácicas considerando

procedimentos ou técnicas específicas, como por exemplo, as repercussões pró-inflamatórias do uso de ventilação mono-pulmonar, os efeitos da isquemia e reperfusão entre outras intervenções que este modelo permite.

A baixa intensidade da resposta inflamatória deste modelo permite estudar outras intervenções isoladas ou associadas que envolvam maior expressão da inflamação.

6. CONCLUSÃO

6. Conclusões

- ✓ Foi alcançada a padronização de um modelo experimental para estudo da inflamação de procedimentos operatórios torácicos em ratos, com reprodução de condições semelhantes à prática clínica, sendo respeitados todos os aspectos éticos necessários à pesquisa com animais de laboratório.

- ✓ Este modelo mostrou-se tolerante a procedimentos operatórios de longa duração, sendo nula a taxa de mortalidade.

- ✓ O modelo apresentado mostra resposta inflamatória local e sistêmica minimamente detectada no pós-operatório imediato a partir das análises do edema, da celularidade e do componente humoral.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências Bibliográficas

1. Schanaider A, Silva PC. Uso de animais em cirurgia experimental. *Acta Cir Bras.* 2004 Jul - Ag; 19(4):441-7.
2. Andersen ML, D´Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LE, Tufik S. Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo; 2004; 5-113.
3. Petroianu A. Aspectos éticos na pesquisa em animais. *Acta Cir Bras.* 1996; 11(3):157-64.
4. Schnaider TB, Souza C. Aspectos éticos da experimentação animal. *Rev Bras Anesthesiol.* 2003 Apr; 53(2):278-85.
5. Weibel ER. The physiologist's ethical dilemmas. *News Physiol Sci.* 2002 Feb; 17:43-6.
6. Hagelin J, Hau J, Carisson HE. The refining influence of ethics committees on animal experimentation in Sweden. *Lab Anim.* 2003 Jan; 37(1):10-8.
7. Benos DJ, Fabres J, Farmer J, Gutierrez JP, Hennessy K, Kosek D, Lee JH, Olteanu D, Russell T, Shaikh F, Wang K. Ethics and scientific publication. *Adv Physiol Educ.* 2005 Jun; 29(2):59-74.
8. Morrison AR. Developing an ethical view on the use of animals biomedical research. *Physiologist.* 2002 Jun; 45(3):135.
9. Fagundes DJ, Taha MO. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. *Acta Cir Bras.* [serial online] 2004 Jan-Feb; 19(1). Available from: <http://www.scielo.br/acb>.
10. Tuñón MJ, Alvarez M, Culebras JM, González-Gallego C. An overview of animal models for investigating the pathogenesis and therapeutic strategies in acute hepatic failure. *World J Gastroenterol.* 2009 Jul; 15(25):3086-98.
11. Johnson PD, Besselsen DG. Practical aspects of experimental design in animal research. *ILAR J.* 2002; 43(4):202-6.

12. Pass D, Freeth G. The rat. ANZCCART News 1993; 6(4): 1-4 Summer Insert.
13. Pritchett KR, Corning BF. Biology and Medicine of rats. In: Reuter JD, Suckow MA. Laboratory Animal Medicine and Management Ithaca, New York, USA; 2004.
14. Kastner A, Gauthier P. Are rodents an appropriate pre-clinical model for treating spinal cord injury? Examples for the respiratory systems. Exp Neurol. 2008 Oct; 213(2):249-56.
15. Steen RG, Kwitek-Black AE, Glenn C, Gullings-Handley J, Etten WV, Atkinson OS, Appel D, et al. A high-density integrated genetic linkage and radiation hybrid map of the laboratory rat. Genome Res. 1999 Jun; 9(6):AP1-8.
16. Bihoreau MT, Gauguier D, Kato N, Hyne G, Lindpaintner K, Rapp JP, James MR, Lathrop GM. A linkage map of the rat genome derived from three F2 crosses. Genome Res. 1997 May; 7(5):434-40.
17. Niklas W, Baneux P, Boot R, Decelle T, Deeny AA, Fumanelli M, Illgen-Wilcke B; FELASA (Federation of European Laboratory Animal Science Associations working group on health monitoring of rodent and rabbit colonies). Recommendations for the health monitoring of rodent and rabbit colonies in breeding and experimental units. Lab Anim. 2002 Jan; 36(1):20-42.
18. Dawkins PA, Stockley RA. Animal models of chronic obstructive pulmonary disease. Thorax 2001 Dec; 56(12):972-7.
19. Nawaka S, Abolhoda A, Ross HM, Brooks A, Burt ME. Sequential bilateral isolated lung perfusion in the rat: an experimental model. Ann Thorac Surg. 1997 Mar; 63(3):796-9.
20. Hebel R, Stromberg MW. Anatomy of the laboratory rat. Baltimore, USA: The Williams & Wilkins Company; 1976.
21. Tsujino I, Kawakami Y, Kaneko A. Comparative simulation of gas transport in airway models of rat, dog and human. Inhal Toxicol. 2005 Aug; 17(9):475-85.
22. Ganong WF. Fisiologia Médica. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill Interamericana do Brasil. 22 ed, 2006. Título original: Review of Medical Physiology.

23. Hawkins P. Recognizing and assessing pain, suffering and distress in laboratory animals: a survey of current practice in the UK with recommendations. *Lab Anim.* 2002 Oct; 36(4):378-95.
24. Carstens E, Moberg GP. Recognizing pain and distress in laboratory animals. *ILAR J.* 2000; 41(2):62-71.
25. Gleed RD, Ludders JW. Recent advances in veterinary anesthesia and analgesia: companion animals. Disponível em: http://www.ivis.org/advances/Anesthesia_Gleed/toc.asp> Acesso em 14 de agosto de 2009
26. [No authors listed] Pain and Distress. Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs. Report of the Federation of European Laboratory Animal Science Associations (FELASA) working group on pain and distress accepted by the FELASA board of management November 1992. *Lab Anim.* 1994 Apr; 28(2):97-112.
27. Langkilde T, Shine R. How much stress do researchers inflict on their study animals? A case study using a scincid lizard, *Eulamprus heatwolei*. *J Exp Biol.* 2006 Mar; 209(Pt 6):1035-43.
28. Shanely RA, Gammeren DV, DeRuisseau KC, Zergerouglu AM, McKenzie MJ, Yarasheski KE, Powers SK. Mechanical ventilation depresses protein synthesis in the rat diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Nov; 170(9):994-9.
29. Whitehead T, Slutsky AS. The pulmonary physician in critical care* 7: ventilator induced lung injury. *Thorax* 2002 Jul; 57(7):635-42.
30. Baudouin SV. Ventilator induced lung injury and infection in the critically ill. *Thorax* 2001 Sep; 56 Suppl II:ii50-7.
31. Moriondo A, Mukenge S, Negrini D. Transmural pressure in rat initial subpleural lymphatics during spontaneous or mechanical ventilation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 Jul; 289(1):H263-9.
32. Prost N, Dreyfuss D, Saumon G. Evaluation of two-way protein fluxes across the alveolo-capillary membrane by scintigraphy in rats: effect of lung inflation. *J Appl Physiol.* 2007 Feb; 102(2):794-802.

33. Rácz GZ, Gayan-Ramirez G, Testelmans D, Cadot P, Paepe K, Zádor E, Wuytack F, Decramer M. Early changes in rat diaphragm biology with mechanical ventilation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003 Aug; 168(3):297-304.
34. Yang I, Luo J, Bourdon J, Lin MC, Gottfried SB, Petrof BJ. Controlled mechanical ventilation leads to remodeling of the rat diaphragm. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002 Oct; 166(8):1135-40.
35. Santos CC, Slutsky AS. Cellular responses to mechanical stress. Invited review: mechanisms of ventilator-induced lung injury: a perspective. *J Appl Physiol*. 2000 Oct; 89:1645-55.
36. Grichnik KP, D'Amico TA. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome after pulmonary resection. *Semin Cardiothorac Vasc Anesth*. 2004 Dec; 8(4):317-34.
37. Agarwal R, Srinivas R, Nath A, Jindal SK. Is the mortality higher in the pulmonary vs the extrapulmonary ARDS? *Chest* 2008 Jun; 133(6):1463-73.
38. Matthay MA, Bhattacharya S, Gaver D, Ware LB, Lim LHK, Syrkin O, Eyal F, Hubmayr R. Ventilator-induced lung injury: in vivo and in vitro mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002 Oct; 283(4):L678-82.
39. Veldhuizen RA, Slutsky AS, Joseph m, McCaig L. Effects of mechanical ventilation of isolated mouse lungs on surfactant and inflammatory cytokines. *Eur Respir J*. 2001 Mar; 17(3):488-94.
40. Fusco LB, Fernandes PMP, Xavier AM, Pazetti R, Rivero CHRF, Capelozzi VL, Jatene FB. Modelo experimental de enfisema pulmonar em ratos induzido por papaína. *J Pneumol*. 2002 Jan-Feb; 28(1):1-7.
41. Yulug E, Techinbas C, Ulusoy H, Alver A, Yenilmez E, Aydin S, Cekiç B, Topbas M, Imamoglu M, Arvas H. The effects of oxidative stress on the liver and ileum in rats caused by one-lung ventilation. *J Surg Res*. 2007 May, 139(2):253-60.
42. Perrot M, Quadri SM, Imai Y, Keshavjee S. Independent ventilation of the graft and native lungs in vivo after rat lung transplantation. *Ann Thorac Surg*. 2005 Jun; 79(6):2169-71.
43. Tekinbas C, Ulusoy H, Yulug E, Erol MM, Alver A, Yenilmez E, Geze S, Topbas M. One-lung ventilation: for how long? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007 Aug; 134(2):405-10.

44. Cakar N, Akinci O, Tugrul S, Ozcan PE, Esen F, Eraksoy H, Cagatay A, Telci L, Nahum A. Recruitment maneuver: Does it promote bacterial translocation? *Crit Care Med.* 2002 Sep; 30(9): 2103-6.
45. Farias LL, Faffe DS, Xisto DG, Santana MCE, LOassance R, Prota LFM, Amato MB, Morales MM, Zin WA, Rocco PRM. Positive end-expiratory pressure prevents lung mechanical stress caused by recruitment/derecruitment. *J Appl Physiol.* 2005 Jan; 98:53-61.
46. Sánchez PG, Martins LK, Martins FK, Schimer R, Cardoso PFG, Andrade CF. Technical modification of unilateral lung transplantation in rats. *J Bras Pneumol.* 2007 Aug; 33(4):448-53.
47. Valença SS, Kloss ML, Bezerra FS, Lanzetti M, Silva FL, Porto LC. Efeitos da hiperóxia sobre o pulmão de ratos Wistar. *J Bras Pneumol.* [online] 2007 Nov-Dec; 33 (6):655-62.
48. Delbin, M. A.; Moraes, C.; Camargo, E.; Mussi, R. K.; Antunes, E.; Nucci, G.; Zanesco, A. Influence of physical preconditioning on the responsiveness of rat pulmonary artery after pulmoray ischemia/ reperfusion. *Comp Biochem Physiol A Mol & Integr Physiol.* 2007 Jul,147(3):793-8.
49. Frank JA, McAuley DF, Gutierrez JA, Daniel BM, Dobbs L, Matthay MA. Differential effects of sustained inflation recruitment maneuvers on alveolar epithelial and lung endothelial injury. *Crit Care Med.* 2005 Jan; 33(1):181-8.
50. Stabernack C, Zhang Y, Sonner JM, Laster M, Eger EI. Thiopental produces immobility primarily by supraspinal actions in rats. *Anesth Analg.* 2005 Jan; 100(1):128-36.
51. Rodrigues SF, Oliveira MA, Martins JO, Sannomiya P, Tostes RC, Nigro D, Carvalho MHC, Fortes ZB. Differential effects of chloral hydrate- and ketamine/xylazine- induced anesthesia by the s.c. route. *Life Sci.* 2006 Sep; 79(17):1630-7.
52. Hara K, Harris A. The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. *Anesth Analg.* 2002 (Feb); 94(2):313-8.
53. Koblin DD. Urethane: help or hindrance? *Anesth Analg.* 2002 Feb; 94(2):241-2.
54. Descorps-Declère A, Sauviat MP, Samii K, Lecarpentier Y. Mechanical and electrophysiological effects of thiopental on rat cardiac left ventricular papillary muscle. *Br J Anaesth.* 2001 Jan; 86(1):103-9.

55. Kabara S, Hirota K, Yoshioka H, Kudo T, Ishihara H, Matsuki A. Differential effects of thiopental on methacholine- and serotonin-induced bronchoconstriction in dogs. *Br J Anaesth*. 2003 Sep; 91(3):379-84.
56. Brookes ZL, Reilly CS, Brown NJ. Differential effects of propofol, ketamine, and thiopental anaesthesia on the skeletal muscle microcirculation of normotensive and hypertensive rats in vivo. *Br J Anaesth*. 2004 Aug; 93(2):249-56.
57. Kolh P, Lambermont B, Ghuysen A, Tchana-Sato V, Dogné JM, D'Orio V, Gerard P, Larbuisson R, Limet R. Comparison of the effects of propofol and pentobarbital on left ventricular adaptation to an increased afterload. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004 Sep; 44(9):294-301.
58. Marshall S, Milligan A, Yates R. Experimental techniques and anaesthesia in the rat and mouse. *ANZCCART News* 1994 Mar; 7(1):1-4.
59. Tanaka S, Tsuchida H, Nakabayashi K, Seki S, Namiki A. The effects of sevoflurane, isoflurane, halothane, and enflurane on hemodynamic responses during an inhaled induction of anesthesia via a mask in humans. *Anesth Analg*. 1996 Apr; 82(4):821-6.
60. Liu R, Ishibe Y, Okazaki N, Ueda M, Hirosawa J. Volatile anesthetic regulate pulmonary vascular tension through different potassium channel subtypes in isolated rabbit lungs. *Can J Anesth*. 2003 Mar; 50(3):301-4.
61. Liu R, Ishibe Y, Ueda M. Isoflurane-sevoflurane administration before ischemia attenuates ischemia-reperfusion-induced injury in isolated rat lungs. *Anesthesiology* 2000 Mar; 92(3):833-40.
62. Liu R, Ishibe Y, Ueda M, Hang Y. Isoflurane administration before ischemia and during reperfusion attenuates ischemia/reperfusion-induced injury of isolated rabbit lungs. *Anesth Analg*. 1999 Sep; 89(3):561-5.
63. Kurtz TW, Griffin KA, Bidani, AK, Davisson RL, Hall, JE. Recommendations for blood pressure measurement in humans and experimental animals – Part 2: blood pressure measurement in experimental animals: a statement for professionals from the subcommittee of professional and public education of the American Heart Association Council on high blood pressure research. *Hypertension* 2005 Feb; 45(2):299-310.
64. Mayer J. Analgesia and anesthesia in rabbits and rodents. In: NAVC Proceeding 2006, Internet Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca NY 2006 (www.ivis.org).

65. Gothard, J. Lung injury after thoracic and one-lung ventilation. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2006 Feb; 19(1):5-10.
66. Cirino G, Fiorucci S, Sessa WC. Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? *TRENDS Pharmacol Sci.* 2003 Feb; 24(2): 91-5.
67. Lawrence T, Willoughby DA, Gilroy DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2002 Oct; 2(10):787-95.
68. Simon SI, Green CE. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. *Annu Rev Biomed Eng.* 2005; 7:151-85.
69. Paparella D, Yau TM, Young E. Cardiopulmonary bypass induced inflammation: pathophysiology and treatment. An update. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2002 Feb; 21(2):232-44.
70. Cuzzocrea S, Pisano B, Dugo L, Ianaro A, Maffia P, Patel NSA, Paola RD, Ialenti A, Genovese T, Chatterjee PK, Rosa MD, Caputi AP, Thiemermann C. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor- γ , reduces acute inflammation. *Eur J Pharmacol.* 2004 Jan; 483(1):79-93.
71. Clark SC. Lung injury after cardiopulmonary bypass. *Perfusion* 2006 Jul; 21:225-8.
72. Misthos P, Katsaragakis S, Milingos N, Kakaris S, Sepsas E, Athanassiadi K, Theodorou D, Skottis I. Postresectional pulmonary oxidative stress in lung cancer patients. The role of one-lung ventilation. *European Journal of Cardio-thoracic Surgery* 2005 Mar; 27(3):379-82.
73. Velloso JCR, Barbosa VF, Oliveira OMMF. Pesquisa de produtos naturais: plantas e radicais livres. *Revista Eletrônica de Farmácia* 2007; 4(2):119-30.
74. Grattendick K, Stuart R, Roberts E, Lincoln J, Lefkowitz SS, Bollen A, Moguilevsky N, Friedman H, Lefkowitz DL. Alveolar macrophage activation by mieloperoxidase. A model for exacerbation of lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2002 Jun; 26(6):716-22.
75. Ferreira ALA, Matsubara LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil* 1997; 43(1):61-8.

76. Guyton AC, Hall JE. A célula e o seu funcionamento. In: Guyton AC, Hall JE Fisiologia Humana e Mecanismos das Doenças. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. Título original: Human Physiology and Mechanisms of Disease.
77. Bowler RP, Crapo JD. Oxidative stress in airways. Is there a role for extracellular superoxide dismutase? *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Dec; 166:S38-S43.
78. Cheng YJ, Chan KC, Chein CT, Sun WZ, Lin CJ. Oxidative stress during 1-lung ventilation. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006 Sep; 132(3):513-8.
79. Orfanos SE, Maviommati I, Korovesi I, Roussos C. Pulmonary endothelium in acute lung injury: from basic science to the critically ill. *Intensive Care Med.* 2004 Sep; 30(9):1702-14.
80. Misthos P, Katsaragakis S, Theodorou D, Milingos N, Skottis I. The degree of oxidative stress is associated with major adverse effects after lung restriction: a prospective study. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2006 Apr; 29(4):591-5.
81. Lee JW, Matthay MA. Protein permeability in lung injury: now in real time again? *J Appl Physiol.* 2007 Feb; 102(2):508-9.
82. Williams EA, Quinlan GJ, Anning PB, Goldstraw P, Evans TW. Lung injury following pulmonary resection in the isolated, blood-perfused rat lung. *Eur Respir J.* 1999 Oct; 14(4):745-50.
83. Baudouin SV. Lung injury after thoracotomy. *Br J Anaesth.* 2003 Jul; 91(1):132-42.
84. Moloney ED, Mumby SE, Gajdocsi R, Cranshaw JH, Kharitonov SA, Quinlan GJ, Griffiths MJ. Exhaled breath condensate detects markers of pulmonary inflammation after cardiothoracic surgery. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004 Jan; 169(1):64-9.
85. Saito S, Ogawa J, Minamiya Y. Pulmonary reexpansion causes xanthine oxidase-induced apoptosis in rat lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005 Sep; 289(3):L400-6.
86. Funakoshi T, Ishibe Y, Okazaki N, Miura K, Liu R, Nagai S, Minami Y. Effect of re-expansion after short-period lung collapse on pulmonary capillary permeability and pro-inflammatory cytokine gene expression in isolated rabbit lungs. *Br J Anaesth.* 2004 Apr; 92(4): 558-63.

87. Bianchi RCG, Souza JN, Giaciani CA, Höehr NF, Toro IFC. Fatores prognósticos em complicações pulmonares pós-operatórias: análise de pré-albumina, tempo de ventilação mecânica e outros. *J Bras Pneumol*. 2006; 32(5):489-94.
88. Bhatia M, Mochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol*. 2004 Feb; 202(2):145-56.
89. Jawa RS, Kulaylat MN, Baumann H, Dayton MT. What is new in cytokine research related to trauma/ critical care. *J Intensive Care Med*. 2006 Mar-Apr; 21(2):63-85.
90. Sherwood ER, Kinsky TT. Mechanisms of the inflammatory response. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*. 2004 Sep; 18(3):385-405.
91. Martin P, Leibovich J. Inflammatory cells during wound repair: the good, the bad and the ugly. *TRENDS Cell Biol*. 2005 Nov; 15(11):599-607.
92. Nakamura E, Kitagawa Y, Ozawa S, Suda K, Ando N, Ueda M, Kitajima M. Role of steroid administration to reduce inflammation after thoracotomy in a rat surgical stress model. *J Surg Res*. 2006 Oct; 135(2):364-9.
93. DeLong WG Jr, Born CT. Cytokines in patients with polytrauma. *Clin Orthop Relat Res*. 2004 May; (422):57-65.
94. Ness RB, Haggerty CL, Harger G, Ferrell R. Differential distribution of allelic variants in cytokine genes among African Americans and White Americans. *Am J Epidemiol*. 2004 Dec; 1:160(11):1033-8.
95. Han D, Ybanez MD, Ahmadi S, Yeh K, Kaplowitz N. Redox regulation of tumor necrosis factor signaling. *Antioxid Redox Signal*. 2009 Sep; 11(9):2245-63.
96. Lin E, Calvano SE, Lowry SF. Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery* 2000 Feb; 127(2):117-26.
97. Yu M, Zheng X, Witschi H, Pinkerton KE. The role of interleukin-6 in pulmonary inflammation and injury induced by exposure to environmental air pollutants. *Toxicol Sci*. 2002 Aug; 68(2):488-97.
98. McClintock JY, Wagner EM. Role of IL-6 in systemic angiogenesis of the lung. *J Appl Physiol*. 2005 Sep; 99(3):861-6.

99. Avdiushko R, Hongo D, Lake-Bullok H, Kaplan A, Cohen D. IL-10 receptor dysfunction in macrophages during chronic inflammation. *J Leukoc Biol.* 2001 Oct; 70(4):624-32.
100. Ameredes BT, Zamora R, Sethi JM, Liu HL, Kohut LK, Gligonic AL, Choi AM, Calhoun WJ. Alterations in nitric oxide and cytokine production with airway inflammation in the absence of IL-10. *J Immunol.* 2005 Jul 15;175(2):1206-13.
101. Brain SD, Williams TJ. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. *Br J Pharmacol* 1985 Dec; 86:855-860.
102. Bradley PP, Priebe DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982 Mar; 78(3):206-9.
103. Bueno PCS, Bueno CE, Santos ML, Oliveira-Júnior I, Salomão R, Pinheiro BV, Beppu OS. Ventilation with high tidal volume induces inflammatory lung injury. *Braz J Med Biol Res.* 2002 Feb; 35(2):191-8.
104. Unzueta MC, Casas JI, Moral MV. Pressure-controlled versus volume-controlled ventilation during one-lung ventilation for thoracic surgery. *Anesth Analg.* 2007 May; 104(5):1029-33.
105. Grocott HP. Oxygen toxicity during one-lung ventilation: is it time to re-evaluate our practice? *Anesthesiol Clin.* 2008 Jun; 26(2):273-80.
106. Lima RC, Escobar MAS, Diniz R, D'Aconda G, Bergsland J, Salermo T. Avaliação hemodinâmica intra-operatória na cirurgia de revascularização do miocárdio sem o auxílio de circulação extracorpórea. *Rev Bras Circ Cardiovasc.* 2000 Jul-Sep; 15(3):201-11.
107. Basagan-Mogol E, Goren S, Korfali G, Turker G, Kaya FN. Induction of anesthesia in coronary artery bypass graft surgery: the hemodynamic and analgesic effects of ketamine. *Clinics* 2010 Feb; 65(2):133-8.
108. Fuentes JM, Hanly EJ, Bachman SL, Aurora AR, Marohn MR, Talamini MA. Videoendoscopic endotracheal intubation in the rat: a comprehensive rodent model of laparoscopic surgery. *J Surg Res.* 2004 Dec; 122(2):240-8.
109. Lewis CA, Martin GS. Understanding and managing fluid balance in patients with acute lung injury. *Curr Opin Crit Care* 2004 Feb; 10(1):13-7.

110. Soni N, Willians P. Positive pressure ventilation: what is the real cost? *Br J Anaesth.* 2008 Oct; 101(4):446-57.
111. Schumann S, Kirschbaum A, Scießmann SJ, Wagner G, Goebel U, Priebe HJ, Guttman J. Low pulmonary artery flush perfusion pressure combined with high positive end-expiratory pressure reduces oedema formation in isolated porcine lungs. *Physiol Meas.* 2010 Feb; 31(2):261-72.
112. Mussi RK, Toro IF. Negative pressure-pulmonary edema and hemorrhage associated with up airway obstruction. *J Bras Pneumol.* 2008 Jun; 34(6):420-4.
113. West JB. *Fisiologia Respiratória Moderna. Tradução de Wagner Ribeiro de Souza e Dra. Vilma Ribeiro de Souza Varga. 3.ed. São Paulo: Editora Manole LTDA; 1986. Título original: Respiratory Physiology – the essentials.*
114. Camacho MT, Totapally BR, Torbati D, Wolfsdorf J. Pulmonary and extrapulmonary effects of increased colloid osmotic pressure during endotoxemia in rats. *Chest* 2001 Nov; 120(5):1655-62.
115. Ng CS, Wan IY, Yim AP. Impact of video-assisted thoracoscopic major lung resection on immune function. *Asian Cardiovasc Thorac Ann.* 2009 Aug; 17(4):426-32.
116. Morrison DF, Foss DL, Murtaugh MP. Interleukin-10 gene therapy-mediated amelioration of bacterial pneumonia. *Infect Immun.* 2000 Aug;68(8):4752-8.
117. Liu D, Zeng BX, Shang Y. Decreased expression of peroxisome proliferators-activated receptor- γ in endotoxin-induced acute lung injury. *Physiol Res.* 2006 Aug; 55(3): 291-9.
118. Liu D, Zeng BX, Zhang SH, YAO SL. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor- γ , reduces pulmonary inflammatory response in a rat model of endotoxemia. *Inflamm Res.* 2005 Nov; 54(11):464-70.
119. Ranieri VM, Suter PM, Tortorella C, De Tullio R, Dayer JM, Brienza A, et al. Effect of mechanical ventilation on inflammatory mediators in patients with acute respiratory distress syndrome: a randomized controlled trial. *JAMA* 1999 Jul; 282(1):54-61.
120. Febbraio MA, Pedersen BK. Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *FASEB J.* 2002 Sep; 16(11):1335-47.

121. Risnes I, Ueland T, Lundblad R, Mollnes TE, Baksaas ST, Aukrust P, Svennevig JL. Changes in the cytokine network and complement parameters during open heart surgery. *Interact Cardiovasc Thorac Surg.* 2003 Mar; (2):19-24.

8. BIBLIOGRAFIA DE NORMATIZAÇÕES

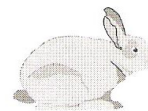
Normas, procedimentos e orientações para publicações de dissertações e teses da
Faculdade de Ciências Médicas – 2008.

9. ANEXO

Anexo 1 - Carta de aprovação de Comitê de Ética em Pesquisa Experimental



UNICAMP



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº **1609-1**, sobre "**Desenvolvimento de um modelo experimental com ratos para estudo da inflamação de procedimentos cirúrgicos pulmonares**", sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Ricardo Kalaf Mussi / Camila Ferreira Leite**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **15 de setembro de 2008**.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº **1609-1**, entitled "**Development of an experimental model with rats for study the pulmonary inflammation in surgical procedures**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **September 15, 2008**.

Campinas, 25 de setembro de 2008.

Prof. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.ib.unicamp.br/ceea/>