ANA CAROLINA BERTOLACI ALVES PENNA

**Avaliação da resposta inflamatória provocada pelo
colapso pulmonar induzido em eqüinos hípidos**

São Paulo

2006

ANA CAROLINA BERTOLACI ALVES PENNA

Avaliação da resposta inflamatória provocada pelo colapso pulmonar induzido em eqüinos hípidos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Clínica Cirúrgica Veterinária

Orientador:

Prof. Dr. André Luis do Valle De Zoppa

São Paulo

2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1774
FMVZ

Penna, Ana Carolina Bertolaci Alves

Avaliação da resposta inflamatória provocada pelo colapso pulmonar induzido em eqüinos hípidos / Ana Carolina Bertolaci Alves Penna. – São Paulo: A. C. B. A. Penna, 2006.
100 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2006.

Programa de Pós-graduação: Clínica Cirúrgica Veterinária.
Área de concentração: Clínica Cirúrgica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. André Luis do Valle De Zoppa.

1. Eqüinos. 2. Toracoscopia. 3. Colapso pulmonar. 4. Inflamação.
I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da resposta inflamatória provocada pelo colapso pulmonar induzido em equinos hípidos", Protocolo nº462/2004, utilizando 12 equinos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. André Luis do Valle de Zoppa, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendun".

(We certify that the Research "Inflammatory response induced by pulmonary collapse in horses" protocol number 462/2004, utilizing 12 horses, under the responsibility of Prof. Dr. André Luis do Valle de Zoppa, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendun", meeting.

São Paulo, 14 de maio de 2004

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: PENNA, Ana Carolina Bertolaci Alves

Título: Avaliação da resposta inflamatória provocada pelo colapso pulmonar induzido em eqüinos hípidos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*À minha família, especialmente meus pais
que foram os mais importantes
responsáveis pela minha formação e
conquistas*

*Ao meu marido Fred, com quem divido uma
grande, se não a maior felicidade: Gabriel.*

*Ao meu filho Gabriel, sem dúvida um
grande companheiro nessa etapa da minha
vida*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. André Luis do Valle De Zoppa, pela orientação, apoio, confiança e acima de tudo, pela amizade sempre presente

À Dra. Cristina Massoco, amiga Cris em quem me espelho, muito obrigada por toda a dedicação desde o começo.

À amiga Renata. Você tem toda razão: teria mesmo sido muito chato se fosse diferente... Obrigada por tudo!!!!!!!

Ao meu companheiro, Fred, por toda a ajuda e paciência

Aos colegas de pós-graduação, Alexandre, Tati e Romero, pelo apoio indispensável nos experimentos

Ao amigo Rodrigo Cruz, sempre disposto a ajudar

À amiga Sandra pela dedicação, quando era muito difícil ter só duas mãos...

Aos funcionários do HOVET FMVZ-USP, especialmente Henrique e Cícero, sempre presentes e prontos para ajudar a qualquer hora

Aos residentes e estagiários pelo cuidado e responsabilidade com os animais

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos de Sá-Rocha, por ter disponibilizado o espaço de trabalho e equipamentos no departamento de Patologia da FMVZ-USP

Aos colegas e funcionários do VPT, que hoje posso chamar de amigos, muito obrigada pela ajuda nos meus primeiros passos no laboratório

Aos amigos do Laboratório Hípico de São Paulo, especialmente Alma e Samantha por tudo que me ensinaram

A todos os meus professores, pelos ensinamentos e dedicação

Às amigas Thais e Ju pela amizade tão verdadeira que me apóia há muito tempo

Ao Ney, secretário do departamento de cirurgia, pela dedicação para que tudo desse certo no final

A todos os amigos, que mesmo de longe sempre me apoiaram

À Capes, pelo auxílio financeiro concedido na forma de bolsa de mestrado

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro para realização do projeto

Aos funcionários da biblioteca da FMVZ sempre tão dispostos a ajudar

Aos que participaram e ajudaram, mesmo que involuntariamente nesse trabalho: High Head, Príncipe, Preto Véio, Felomenal, Minelli, Bruno, Prexedis, Bob, Trinta, Pingo, Salsicha, Zoreia, Late Palm, Roleta, Fuzarca e Guigui. E aos que ao longo desses anos todos foram tão importantes para mim, mesmo ser ter consciência disso.

A Tati, Rê, Alexandre, Binha, Rosendo e Sandra, por terem ajudado a dar uma casa para alguns dos nossos animais

Enfim, muito obrigada a todos que mesmo indiretamente contribuíram nesse trabalho, por terem me apoiado durante todo esse tempo. Ajudar uma barriguda chorona deve ter sido muito difícil, assim como cuidar do pequeno Gabriel, tão presente nos corredores da faculdade!!!!

RESUMO

PENNA, A. C. B. A. **Avaliação da resposta inflamatória provocada pelo colapso pulmonar induzido em eqüinos hígidios.** [Evaluation of the inflammatory reaction due to lung collapse in healthy equines]. 2006. 100 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

O organismo apresenta diversas reações integradas em resposta à injúria, com o objetivo de restaurar a homeostase. Dentre esses mecanismos, destaca-se a resposta inflamatória, já que sem ela a injúria que acometeu o organismo dificilmente seria resolvida. Todo procedimento cirúrgico representa uma injúria para o organismo. As técnicas cirúrgicas minimamente invasivas tendem a gerar respostas deletérias mais brandas aos animais; as cirurgias torácicas envolvem, porém, um trauma adicional caracterizado pelo colapso pulmonar, que se faz necessário mesmo nas técnicas minimamente invasivas. Foram realizados em humanos diversos estudos que avaliam as vantagens desta técnica em relação à toracotomia; na espécie eqüina, a toracosopia vem sendo aplicada na rotina hospitalar desde a década de 80 e relatos afirmam ser um procedimento cirúrgico seguro. No entanto, não foram descritos dados referentes à resposta inflamatória decorrente deste procedimento. Desta forma, este estudo visou avaliar a resposta inflamatória sistêmica e local decorrente da técnica, na qual a indução e redução do colapso pulmonar foram feitas de maneira controlada. Foram utilizados 12 eqüinos hígidios, de raça e idade variadas, de ambos os sexos. Os animais foram divididos em dois grupos, submetidos à toracosopia com duração de 30 e 60 minutos (grupos 1 e 2, respectivamente). As pressões intratorácicas foram controladas em todos os procedimentos, permitindo controle da indução e redução do colapso pulmonar, diminuindo assim a ocorrência de pneumotórax residual. Amostras de sangue, líquido pleural e lavado bronco alveolar foram coletadas antes do procedimento (M1), e duas (M6), seis (M7) e 24 horas (M8) após o início do colapso pulmonar. Estas foram usadas para avaliação da resposta inflamatória por meio de mensuração da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelas células presentes em cada tipo de amostra, utilizando-se como metodologia a citometria de fluxo, e para a quantificação de citocinas por ELISA (IL-1 β) ou por ensaio biológico

(TNF- α e IL-6). Para análise dos resultados foi considerada a possível influência dos fatores grupo e momento experimental em cada uma das variáveis estudadas. Os valores de *burst* oxidativo apresentados pelas células das amostras em questão não sofreram influência dos fatores avaliados. Não foi possível avaliar a variação dos níveis de IL-1 β pela metodologia aplicada. Os níveis de TNF- α sofreram influência estatisticamente significativa do fator momento experimental nas amostras de lavado broncoalveolar e líquido pleural, sendo que M6 apresentou maiores níveis desta citocina; não foi observada influência desses fatores nos níveis plasmáticos da mesma. Em relação a IL-6, foi observada influência do fator momento experimental nas amostras de plasma e lavado broncoalveolar, e de ambos os fatores nas amostras de líquido pleural, sendo que os níveis dessa citocina apresentaram um padrão de aumento mais tardio que o apresentado pelo TNF- α . Concluímos que o colapso pulmonar induzido por infusão de gás CO₂ em eqüinos hígidos provocou uma reação inflamatória localizada na cavidade torácica, em que não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos experimentais. Assim, a cirurgia torácica videoassistida em eqüinos com até 60 minutos de duração pode ser indicado sem que fatores oriundos da técnica cirúrgica agravem a enfermidade. Uma vez que não foi observada influência dos fatores estudados nos valores de pressão intratorácica, acreditamos que a metodologia aplicada foi adequada para a realização da técnica, provendo adequado controle e redução da ocorrência de pneumotórax residual, que somente foi observado nos casos onde ocorreu pneumotórax bilateral durante o procedimento cirúrgico.

Palavras-chave: Eqüinos. Toracosopia. Colapso pulmonar. Inflamação

ABSTRACT

PENNA, A. C. B. A. **Evaluation of the inflammatory reaction due to lung collapse in healthy equines.** [Avaliação da resposta inflamatória provocada pelo colapso pulmonar induzido em eqüinos hígidos]. 2006. 100 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Organisms present several integrative reactions to injury, aiming at the reestablishment of homeostasis. Among these mechanisms is the inflammatory reaction, for without it the initial injury would hardly be solved. Every surgical procedure represents an injury for living organisms. Minimally invasive surgical techniques tend to induce milder negative reactions in animals; nonetheless, thoracic surgery leads to an additional trauma characterized by lung collapse, required even in minimally invasive surgical techniques. Several human studies have assessed the advantages of this technique compared to thoracotomy; in horses, the use of thoracoscopy has increased in routine procedures since the 1980s, and reports point to the safety of its usage. Nevertheless, no data regarding the inflammatory reaction induced by this procedure has been reported. In this matter, our study aimed at the evaluation the local and systemic inflammatory response associated with this technique, in which the induction and reduction of lung collapse were carefully controlled. 12 healthy horses of varied breeds, age, and of both genders were used. Animals were divided in two groups, and submitted to thoracoscopy for 30 or 60 minutes (groups 1 and 2, respectively). Intrathoracic pressure was controlled in every procedure, allowing the induction and reduction of lung collapse, reducing the chance of residual pneumothorax. Samples of blood, pleural fluid, and bronchoalveolar fluid were harvested before the procedure (M1), and two (M6), six (M7) and twenty-four hours (M8) after the onset of lung collapse. These samples were employed for the evaluation of the inflammatory reaction through measurement of reactive oxygen species (ROS) by cells present in each sample, using flow cytometry, and for cytokine quantification by ELISA (IL-1 β) or bioassay (TNF- α and IL-6). For the analysis of our results the factors *group* and *experimental timepoint* were considered for every variable studied. Values of oxidative burst displayed by cells in each sample did not depend on the factors analyzed. Variation of IL-1 β levels could not be

detected by the methods employed here. Levels of TNF- α were statistically influenced by the factor experimental *timepoint* in pleural fluid and bronchoalveolar fluid, and the highest levels of this cytokine were observed in M6; no influence of these factors on its plasmatic levels was observed. Regarding IL-6, we found an influence of the factor *timepoint* in samples of plasma and bronchoalveolar fluid, and an influence of both factors in samples of pleural fluid, being the highest levels of this cytokine found later than the TNF- α peak. We conclude that the lung collapse induced by CO₂ in healthy horses caused an inflammatory reaction restricted to the thoracic cavity, without significant differences between groups 1 and 2. Thus, video-assisted thoracic surgery in horses lasting up to 60 minutes can be recommended leads to no signs of direct negative effects of the technique that could worsen the patient condition. Since we found no influence of either factor studied on values of thoracic pressure, we conclude that the methods employed for the surgery were adequate, supplying sufficient control over the occurrence of residual pneumothorax, observed only in cases of bilateral pneumothorax during the procedure.

Keywords: Equine. Thoracoscopy. Lung collapse. Inflammation

LISTA DE ABREVIações

ANOVA	análise de variância
CO ₂	dióxido de carbono
CRP	proteína c reativa
DCFH	2'- 7'- diclorofluoresceína diacetato
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EPM	erro padrão da média
ERO	espécie reativa de oxigênio
FL-1	canal 1 de fluorescência
FSC	dispersão frontal (<i>forward scatter</i>)
GM-CSF	fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos
H ₂ O ₂	peróxido de oxigênio
IL	interleucina
kV	kilovoltagem
LBA	lavado bronco-alveolar
LP	líquido pleural
LPS	lipopolissacarídeo de parede bacteriana
mA	miliamperagem
MCP	proteína quimioatrativa de monócitos
mmHg	milímetros de mercúrio
NaCl	cloreto de sódio
NK	<i>natural killer</i>
O ₂ -	radical superóxido
OH-	radical hidroxila
PaCO ₂	pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial
PAF	fator ativador de plaquetas
PaO ₂	pressão parcial de oxigênio no sangue arterial
PBS	salina tamponada com fosfatos
pH	potencial hidrogeniônico
PIT	pressão intratorácica

PSI	puro sangue inglês
rIL	interleucina recombinante
RPM	rotações por minuto
SAA	amilóide A sérico
SaO2	saturação de oxigênio no sangue arterial
SFB	soro fetal bovino
SRD	sem raça definida
SSC	dispersão lateral (<i>side scatter</i>)
sTNF-R	receptor solúvel do fator de necrose tumoral
TNF	fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
	2.1 A CAVIDADE PLEURAL E ANÁLISE DO LÍQUIDO PLEURAL.....	17
	2.2 TORACOCENTESE	19
	2.3 LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)	20
	2.4 A UTILIZAÇÃO DA TORACOSCOPIA E SUAS IMPLICAÇÕES.....	22
	2.5 RESPOSTA ORGÂNICA À INJÚRIA – INFLAMAÇÃO	24
	2.6 AVALIAÇÃO DA INJÚRIA APÓS UMA CIRURGIA ENVOLVENDO COLAPSO PULMONAR.....	28
3	OBJETIVOS	31
4	MATERIAIS E MÉTODOS	32
	4.1 ANIMAIS.....	32
	4.2 EQUIPAMENTOS	33
	4.2.1 Cirurgia torácica vídeoassistida	33
	4.2.2 Lavado Broncoalveolar.....	34
	4.2.3 Toracocentese	34
	4.2.4 Avaliação do pneumotórax residual	34
	4.2.5 Citometria de fluxo	35
	4.2.6 Hemogasometria	35
	4.2.7 Leucograma	35
	4.2.8 Determinação do TNF- α , IL-1 β e IL-6	35

4.3 MÉTODOS	36
4.3.1 Delineamento experimental	36
4.3.2 Exame clínico	36
4.3.3 Coleta de sangue venoso e arterial	36
4.3.4 Protocolo anestésico	37
4.3.5 Lavado broncoalveolar	37
4.3.6 Toracocentese	39
4.3.7 Toracosopia	40
4.3.8 Avaliação radiográfica para verificação da ocorrência de pneumotórax residual	41
4.3.9 Avaliação laboratorial	42
4.3.9.1 Mensuração do <i>Burst</i> oxidativo	42
4.3.9.2 Mensuração da IL-1 β	43
4.3.9.3 Mensuração da IL-6.....	43
4.3.9.4 Mensuração do TNF- α	43
4.3.9.5 Avaliação do leucograma e dosagem de fibrinogênio	44
4.3.9.6 Avaliação da hemogasometria	45
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
 5 RESULTADOS	 46
5.1 EXAME CLÍNICO	46
5.1.1 Frequência cardíaca	46
5.1.2 Frequência respiratória.....	47
5.1.3 Temperatura corpórea	47
5.2 PROTOCOLO ANESTÉSICO	48
5.3 LAVADO BRONCOALVEOLAR	49

5.4	TORACOCENTESE	50
5.5	TORACOSCOPIA	52
5.6	OCORRÊNCIA DE PNEUMOTÓRAX BILATERAL	53
5.7	AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DO PNEUMOTÓRAX RESIDUAL.....	55
5.8	AVALIAÇÃO LABORATORIAL.....	56
5.8.1	Burst oxidativo	56
5.8.2	Níveis de IL-1 β	60
5.8.3	Níveis de IL-6	60
5.8.4	Níveis de TNF-α	63
5.8.5	Contagem de células	66
5.8.5.1	Leucócitos circulantes	66
5.8.5.2	Leucócitos no lavado broncoalveolar	68
5.8.5.3	Leucócitos no líquido pleural	69
5.8.6	Níveis plasmáticos de fibrinogênio	71
5.8.7	Hemogasometria arterial	71
5.8.7.1	pH arterial.....	71
5.8.7.2	Pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial – PaCO ₂ arterial.....	72
5.8.7.3	Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial – PaO ₂ arterial	73
5.8.7.4	Saturação de oxigênio no sangue arterial – SaO ₂ arterial.....	74
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	92
	APÊNDICES	99

1 INTRODUÇÃO

O organismo responde a injúria tendo como principal objetivo a restauração da homeostase. Para tanto, uma série de respostas fisiológicas impedem que a lesão se propague. Esses eventos desencadeiam uma cascata coordenada principalmente pelo sistema nervoso central, mas que conta com a participação de outros sistemas orgânicos, como o endócrino e o imunológico. As reações são mediadas por produtos de neutrófilos e macrófagos, e tais mudanças resultam no aumento do metabolismo, lipólise, lise protéica e expansão de fluido extracelular, podendo levar à falência de órgãos (HILL, 2000).

Sabe-se que os procedimentos cirúrgicos são percebidos como injúria, e portanto levam a profundas alterações metabólicas e nos mecanismos de defesa do organismo, dificultando a função pulmonar, podendo levar à hipoxemia (KEHLET, 1999). Essas mudanças estão envolvidas com morbidades pós-operatórias (KEHLET, 1999).

As técnicas cirúrgicas minimamente invasivas, dentre suas outras características e objetivos, têm como finalidade diminuir respostas possivelmente deletérias ao organismo. A toracoscopia, no entanto, intrinsecamente envolve um trauma adicional que consiste no colapso pulmonar (YIM et al., 2000).

Este procedimento cirúrgico vem sendo realizado na espécie eqüina desde a década de 80. Atualmente são descritas aplicações diagnósticas e terapêuticas da toracoscopia. No entanto, não foram realizados estudos que avaliaram a resposta do paciente ao procedimento, bem como suas conseqüências. Para tanto, além da avaliação da resposta sistêmica, o estudo da resposta local, utilizando-se tecido pulmonar ou líquido pleural se faz necessária, uma vez que a injúria pode não provocar alterações sistêmicas.

O presente trabalho aborda a hipótese de que a toracoscopia em eqüinos provoca uma resposta inflamatória passível de avaliação pela dosagem de citocinas circulantes e teciduais. Acreditamos que, por meio deste trabalho, a resposta a esta questão é de grande importância para que se possa fazer uma indicação precisa deste procedimento para cada paciente. A metodologia aplicada objetiva manter o maior controle da indução, manutenção e redução do pneumotórax, dando assim uma maior segurança ao procedimento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A CAVIDADE PLEURAL E ANÁLISE DO LÍQUIDO PLEURAL

A pleura é uma serosa formada por folhetos (parietal e visceral) constituídos por mesotélio e uma fina camada de tecido conjuntivo. Esses folhetos envolvem inteiramente os pulmões, delimitando para cada um, uma cavidade independente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999); essa cavidade é preenchida por uma fina película de líquido que permite o deslizamento dos folhetos durante o movimento respiratório, sendo considerada portanto uma cavidade virtual (DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

O líquido pleural se origina do processo de filtração microvascular e o seu transporte ocorre através de duas barreiras, o endotélio capilar e o interstício da pleura (LAI-FOOK, 2004). A dinâmica da renovação do líquido pleural parece ser diferente entre as espécies, uma vez que se observam pequenas diferenças anatômicas (COWELL et al., 1987; DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002; LAI-FOOK, 2004). Nos grandes animais, o espaço pleural, a pleura visceral e os alvéolos são mais espessos (LAI-FOOK, 2004), além disso, a pleura visceral é irrigada por artérias sistêmicas, assim como a parietal, não existindo portanto um gradiente de pressão, impedindo um fluxo de líquido da pleura parietal para a visceral como ocorre nos pequenos animais, onde a pleura visceral é irrigada por artérias pulmonares (DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002). Desta maneira, nos grandes animais pode ocorrer filtração de líquido pleural através de capilares bronquiais da pleura visceral, enquanto que nos pequenos animais existe a reabsorção de pequenas quantidades de líquido por capilares pulmonares existentes nessa pleura (LAI-FOOK, 2004). Nos eqüinos, o líquido pleural é removido da cavidade pelos vasos linfáticos localizados na pleura, e um aumento no volume de fluido presente na cavidade torácica ocorre quando a taxa de formação excede a remoção do mesmo (DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002).

A pleura apresenta uma grande permeabilidade, sendo assim, em determinadas condições, líquidos ou ainda gases presentes na cavidade são rapidamente absorvidos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999). O acúmulo de líquidos

entre os folhetos visceral e parietal decorrente de um processo inflamatório é comum (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

As efusões pleurais no equino podem ser classificadas como parapneumônicas (relacionada com um quadro de pleuropneumonia), não parapneumônicas (relacionadas a diversas condições, tais como: falência cardíaca, doença hepática crônica, hipoalbuminemia, ruptura diafragmática, pleurite, pneumonias, abscessos pulmonares, neoplasia torácica, injúria traumática, parasitismo e hemotórax) ou ainda idiopáticas, sendo que essas últimas normalmente são associadas a um pior prognóstico (DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002).

O volume, a celularidade e a composição do líquido existente na cavidade usualmente refletem as condições das superfícies pleurais (DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002).

A inflamação pleural secundária a uma doença sistêmica ou ainda com envolvimento do parênquima pulmonar está classicamente envolvida com o desenvolvimento de efusão pleural e com o recrutamento de células fagocitárias, citocinas quimiotáticas, como a IL-8 (interleucina 8) e o MCP-1 (proteína quimiotática de monócitos), permitindo o movimento de células do compartimento vascular para o espaço pleural (neutrófilos seguidos de fagócitos mononucleares) (ANTONY et al., 1993).

Ainda que de ocorrência bastante comum, não se sabia se no caso de efusão pleural bilateral em humanos o líquido acumulado em um hemitórax era semelhante ao outro (KALOMENIDIS et al., 2003). Os mesmos autores realizaram estudo retrospectivo e observaram que o líquido pleural coletado de pacientes com efusão bilateral apresentavam características semelhantes, concluindo que em casos em que a toracocentese diagnóstica se faz necessária, não é necessário que esta seja feita em ambos os lados, a não ser que se tenha uma indicação clínica específica. No entanto, reconhecem a limitação do estudo e sugerem que outros sejam realizados com um número maior de pacientes e com diversas etiologias de efusão pleural.

Sabe-se que a maioria dos cavalos apresenta um mediastino fenestrado, nesse caso, amostras de líquido pleural obtidas de ambos os lados devem ser equivalentes, no entanto, em casos em que se tem doença torácica, os orifícios podem ser obstruídos por fibrina, e conseqüentemente os hemitórax podem não ser

afetados da mesma maneira, tornando necessária a avaliação dos dois hemitórax (DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002).

A contagem total e diferencial de leucócitos nas efusões pleurais são bastante úteis no diagnóstico e manejo de pacientes com efusão pleural, porém o método de avaliação da amostra, assim como seu acondicionamento, podem influenciar nos resultados obtidos (CONNER et al., 2003). Os autores verificaram que apesar dos valores obtidos da contagem manual de leucócitos terem uma equivalência daquela realizada automaticamente, essa última ao realizar a contagem diferencial, tem dificuldade de diferenciar neutrófilos de monócitos e células mesoteliais. Os mesmos autores salientam que a contagem total de leucócitos é alterada quando não se faz uso de anticoagulantes no armazenamento da amostra e que não há diferença na contagem total de leucócitos em amostras refrigeradas por até 24 horas.

O exato volume de líquido pleural e sua composição celular são difíceis de determinar em humanos saudáveis, uma vez que a quantidade de líquido recobrindo a superfície pleural é muito pequena e há dificuldade para que seja realizada uma técnica não traumática de coleta (NOPPEN, 2004; NOPPEN et al., 2000). Foi descrita pelos mesmos autores uma técnica de lavagem pleural com o objetivo de se estudar o líquido pleural em humanos, tornando conhecido o volume e população celular.

2.2 TORACOCENTESE

Segundo Bennett (1986), a avaliação do líquido pleural é essencial para o diagnóstico de doenças pleurais nos eqüinos.

As doenças pleurais podem ser diagnosticadas por meio da análise do líquido pleural, colhido por toracocentese. Essa técnica é indicada quando se tem evidência física, radiográfica ou ultra-sonográfica de efusão ou processos neoplásicos na cavidade pleural (DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002). A toracocentese pode ser realizada em eqüinos em posição quadrupedal, com o animal contido em tronco, associado ou não ao uso de contenção física ou sedação (DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002).

Em relação à posição anatômica para a realização da técnica, é importante que se utilize o bordo cranial da costela como referência, impedindo a laceração do plexo intercostal. No lado direito pode ser utilizado o 6º ou 7º espaços intercostais, cerca de 10 centímetros acima do olécrano ou da junção costochondral, no lado esquerdo pode-se utilizar do 6º ao 9º espaços intercostais de 4 a 6 centímetros acima do nível do olécrano ou imediatamente dorsal da junção costochondral (DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002). O local escolhido para a toracocentese é preparado cirurgicamente e é realizada anestesia local infiltrativa na pele e na musculatura intercostal, uma cânula mamária de 7,5 centímetros acoplada a uma seringa e uma torneira de três vias é então inserida através da musculatura, quando a cavidade é atingida, pode-se perceber uma diminuição da tensão e a amostra é então colhida por sucção (DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002).

O líquido pleural usualmente é facilmente obtido por essa técnica, porém isso pode não ocorrer após a primeira tentativa. Caso a coleta seja improdutiva, pode-se utilizar cateter urinário para cadelas, com 30 centímetros de comprimento. A quantidade de fluido pleural obtido através da toracocentese é variável, sendo as suas características semelhantes às do líquido peritoneal (BENNETT, 1986; COWELL et al., 1987; DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002; WAGNER; BENNETT, 1982). A amostra obtida deve ser acondicionada com anticoagulantes, pois mesmo em animais normais, onde se tem uma quantidade muito pequena de fibrinogênio, a amostra pode ser contaminada com sangue no momento da coleta (DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002).

Complicações relacionadas à técnica são consideradas incomuns, porém quando realizada de maneira inadequada pode resultar em pneumotórax, laceração pulmonar, hemotórax, arritmia cardíaca ou ainda punção de outros órgãos, tais como: intestino, fígado ou coração. Ocasionalmente, pode-se observar celulite localizada no local da punção, nesse caso, deve-se realizar tratamento sintomático (DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002).

2.3 LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA)

O lavado broncoalveolar tem o objetivo de instilar fluido nas vias aéreas e coletá-lo posteriormente, gerando uma amostra que contenha tanto o líquido

existente nas vias aéreas quanto células do epitélio de revestimento da porção distal do trato respiratório. A técnica tem sido empregada em eqüinos no diagnóstico, e mais recentemente, como tratamento das afecções pulmonares, além da avaliação do pulmão de animais submetidos à anestesia geral (ITO et al., 2001; ITO; HOBO; KASASHIMA, 2003). Essa técnica promove uma avaliação mais adequada dos processos do trato respiratório inferior quando comparada ao lavado trans traqueal (LAPOINTE; VRINS; LAVOIE, 1994).

Lapointe, Vrins e Lavoie (1994) descreveram uma técnica para realização do LBA em cavalos, em que utiliza-se endoscópio flexível de 180 centímetros de comprimento e 14mm de diâmetro, sendo esse direcionado até a 4ª ou 6ª geração de brônquios. Se utiliza dessensibilização com 50 a 100 mL de solução de lidocaína a 0,5% e então dois bolus de 250 mL de solução salina isotônica estéril, que é rapidamente instilada e imediatamente recuperada através do canal de trabalho do endoscópio utilizando-se uma bomba de sucção. O volume médio de líquido recuperado nos animais controle (sadios) foi de $53 \pm 15\%$.

É importante que as técnicas de realização do LBA sejam padronizadas, uma vez que é descrita pela literatura a influência da manipulação das amostras nos resultados obtidos, principalmente relativos à citologia (LAPOINTE; VRINS; LAVOIE, 1994), assim como o efeito do volume utilizado e a realização de lavados seqüenciais têm efeitos na contagem celular em cavalos saudáveis (SWEENEY et al., 1992).

Lapointe, Vrins e Lavoie (1994) analisando o lavado broncoalveolar em 14 animais e os efeitos da manipulação da amostra em relação à realização de centrifugação e utilização de cito centrífuga ou centrifugação em lamínula de vidro, verificaram que apesar de não ser verificada diferença estatisticamente significativa na contagem de células antes ou após a centrifugação, análises individuais mostram diferenças marcantes; a centrifugação provoca diminuição na porcentagem de mastócitos nos lavados provenientes de animais que apresentam doença do trato respiratório inferior; a porcentagem de linfócitos é maior nas lâminas obtidas por centrifugação em lamínulas de vidro do que as obtidas em cito centrífugas; a porcentagem de macrófagos em animais hígidos, assim como a de neutrófilos em animais que apresentam doença do trato respiratório inferior é menor nas amostras obtidas por centrifugação em lamínulas de vidro, e ainda observaram que existe

diferença na morfologia das células obtidas pelas diferentes técnicas de centrifugação.

2.4 A UTILIZAÇÃO DA TORACOSCOPIA E SUAS IMPLICAÇÕES

A toracoscopia é um dos métodos de avaliação da cavidade torácica na espécie eqüina, consiste na visibilização da cavidade através de endoscópio rígido ou flexível (ZOPPA et al., 2001) e vem sendo realizada em eqüinos desde 1980 (PERONI et al., 2001; ROSSIER et al., 1990), como meio diagnóstico (MUELLER et al., 1992; ROSSIER et al., 1990; VACHON; FISCHER, 1998) e, também, para o tratamento de afecções torácicas (PERONI et al., 2001; VACHON; FISCHER, 1998; ZOPPA, 2003; ZOPPA et al., 2001), sendo classificada como uma técnica minimamente invasiva.

Segundo Blanc et al. (2002) a toracoscopia tem mostrado grande valor diagnóstico na medicina humana desde que seu trabalho observou que esta técnica melhora a qualidade do diagnóstico da biópsia pleural fechada, permitindo sua realização com observação direta da lesão, no entanto, quando se tem aderências pleurais, estas podem limitar o acesso à cavidade.

Em animais adultos, esta técnica pode ser realizada em posição quadrupedal associando-se a anestesia local à sedativos, e analgésicos quando necessário (PERONI et al., 2000; ZOPPA, 2003; ZOPPA et al., 2001).

Algumas complicações decorrentes da toracoscopia foram descritas, e incluem ocorrência de dor, infecção, pneumotórax e lacerações do tecido pulmonar (MACKEY; WEAT, 1985; MANSMANN; BERNARD - STROTHER, 1985). Na medicina humana, foram descritos casos de morte relacionados à técnica, sepse e casos de empiema, no entanto são raros e de maneira geral o procedimento pode ser considerado eficaz e relativamente seguro no manejo das doenças pleurais (BLANC et al., 2002). Peroni et al. (2000) descrevem ocorrência de pneumotórax residual em dois dos seis animais utilizados no experimento, porém não relatam a ocorrência de pneumotórax bilateral durante os procedimentos.

Peroni et al. (2000) relacionaram sinais de desconforto dependendo da localização do portal cirúrgico, assim como da manipulação do equipamento, os

autores observaram um maior desconforto quando se tinha manipulação no portal localizado no 8º espaço intercostal.

Peroni et al. (2000) realizaram avaliação por meio de exame físico, assim como de leucograma e níveis de fibrinogênio plasmáticos, e contagem de leucócitos no lavado broncoalveolar de animais submetidos à toracoscopia, antes e após 48 horas do procedimento, e não foram observadas diferenças entre os valores obtidos.

Para perfeita visualização do hemitórax a ser examinado é necessário que se induza a instalação de pneumotórax, com conseqüente colapso pulmonar. O pneumotórax pode ser induzido pela perfuração da pleura parietal com auxílio de uma pinça hemostática Crille, provocando influxo passivo de ar na cavidade (PERONI et al., 2001; ZOPPA et al., 2001, 2002) ou por infusão controlada de gás CO₂ (WOLFER et al., 1994).

Em relação às alterações hemodinâmicas que o procedimento pode causar, relatos afirmam que o pneumotórax unilateral induzido com baixo fluxo, e mantido a baixo nível de pressão não provoca alterações hemodinâmicas, de oxigenação, ventilação e metabólicas significativas, em equinos hípidos submetidos à sedação com romifidina e tartarato de butorfanol, sendo que esse protocolo apesar de ser adequado para a realização do procedimento foi responsável pelas alterações hemodinâmicas e de oxigenação nos animais utilizados nesse trabalho (MACHADO, 2003). Da mesma maneira, a detomidina utilizada por Peroni et al. (2000) foi relatada como responsável pelas alterações cardiovasculares e respiratórias observadas em animais submetidos à toracoscopia. Wolfer et al. (1994) concluíram em estudo com 32 pacientes humanos que o uso de insuflação utilizando-se gás CO₂ durante a toracoscopia é seguro, não sendo observados efeitos hemodinâmicos nos pacientes, referentes ao seu uso.

Muitos estudos abordaram a reação inflamatória provocada por procedimentos cirúrgicos tradicionais, comparando-os ainda com procedimentos classificados como minimamente invasivos, por exemplo a laparoscopia. No entanto, esses resultados nem sempre são comparáveis àqueles das cirurgias torácicas, uma vez que nestas é necessário que se tenha um colapso pulmonar instalado, fato que, por si só, pode gerar um trauma adicional ao paciente, podendo levar à resposta orgânica diferente (YIM et al., 2000).

2.5 RESPOSTA ORGÂNICA À INJÚRIA - INFLAMAÇÃO

Inflamação é definida por Majno e Joris (2004) como resposta à injúria local em tecidos vascularizados com o propósito de fornecer leucócitos e plasma ao local (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Portanto, em resposta à injúria, o organismo apresenta diversas reações integradas com o objetivo de restaurar a homeostase (HILL; HILL, 1998; MACKAY, 2000). Sem a ocorrência da inflamação, a injúria que acometeu o organismo jamais seria resolvida (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Neste processo estão envolvidos os sistemas nervoso, endócrino e imunológico (BIFFL et al., 1996).

Cada tipo de célula inflamatória (são elas: neutrófilos, eosinófilos, monócitos/macrófagos, plaquetas, mastócitos/basófilos, linfócitos T, linfócitos B, células NK (*natural killer*), células dendríticas, células endoteliais e fibroblastos) é especializada em uma função, desta maneira, nem todas são recrutadas em todos os eventos inflamatórios (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; MAJNO; JORIS, 2004). Os 11 tipos celulares são normalmente quiescentes e se tornam ativados no foco inflamatório e produzem mediadores inflamatórios, que são definidos como moléculas que são geradas em focos inflamatórios e que modulam a resposta inflamatória de alguma maneira (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; MAJNO; JORIS, 2004).

Desta forma, leucócitos circulantes, entre eles neutrófilos e macrófagos, são rapidamente atraídos para o local de lesão. No tecido, produzem e estimulam células residentes (como os fibroblastos) a sintetizar e liberar diversos mediadores do processo inflamatório, tais como citocinas, fator de ativação plaquetária (PAF), radicais livres de oxigênio, óxido nítrico e metabólitos do ácido araquidônico. Muitas moléculas que participam deste processo exercem tanto funções locais (parácrina) quanto à distância (endócrina), em órgãos como fígado, pulmões, intestinos e musculatura esquelética. Além disso, após a injúria ocorre a ativação do sistema complemento, estimulando ainda mais a produção de citocinas por monócitos e macrófagos, com relevância para a inflamação e reparação tecidual (HILL, 2000). O TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e a IL-1 (interleucina 1) são as principais citocinas que modulam a inflamação agindo no endotélio, leucócitos, fibroblastos e induzindo a resposta de fase aguda sistêmica juntamente com a IL-6 (interleucina 6);

sua secreção pode ser estimulada pela presença de endotoxina, imunocomplexos, injúria física e outros estímulos inflamatórios (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Citocinas são pequenas proteínas responsáveis pela “comunicação” celular, são secretadas por quase todas as células, não só as inflamatórias, e controlam a sobrevivência, o crescimento, a diferenciação, e a função de outras células, quase sempre a uma distância curta. Cada uma pode ser secretada por diversos tipos celulares e se ligam a receptores específicos. São descritas centenas de citocinas, a sua classificação é difícil pois são multifuncionais com efeitos redundantes (ABBAS, 2005; MAJNO; JORIS, 2004).

De modo global, após a ocorrência de uma injúria, é desencadeada a chamada resposta de fase aguda, que inclui a produção de algumas proteínas por hepatócitos estimulados pelas citocinas (GRUYS; OBWOLO; TOUSSAINT, 1994; KENT; GOODALL, 1991). Estas são chamadas, coletivamente, de proteínas de fase aguda, dentre as quais se destacam a CRP (Proteína C Reativa) e o SAA (amilóide A sérico), que apresentam um aumento rápido, sendo já detectáveis na circulação após 4 a 5 horas da injúria e permanecendo elevadas durante as próximas 24 horas (GRUYS; OBWOLO; TOUSSAINT, 1994). A análise das proteínas de fase aguda de maneira eficaz depende da obtenção de antisoros específicos para cada uma delas na espécie estudada (KENT; GOODALL, 1991; YAMASHITA et al., 1991).

Yim et al. (2000) citaram o importante papel das citocinas na indução da resposta de fase aguda decorrente do trauma cirúrgico e Gruys, Obwolo e Toussaint (1994) atribuem ao $\text{TNF-}\alpha$ à IL-1 e à IL-6 a ativação da formação das proteínas de fase aguda e ainda relatam que a IL-6 inibe a produção de IL-1 e $\text{TNF-}\alpha$ por monócitos.

A reparação tecidual durante o período pós-cirúrgico depende da ação de diversos tipos celulares, como os leucócitos, trombócitos e fibroblastos, além de vários mediadores inflamatórios, como as citocinas, as quais exercem importante papel de comunicação entre células, e fatores de crescimento, responsáveis por controlar a proliferação, diferenciação e maturação de células e matriz extracelular (WEISSFLOG et al., 1999). Por exemplo, além de atuar em diversas linhagens celulares tumorais, o $\text{TNF-}\alpha$ age em diversas outras células, tais como os polimorfonucleares, e estimula a produção de outras citocinas, entre elas a IL-1 e IL-6 (MORRIS; MOORE, 1991; MORRIS; MOORE; CROWE, 1991; WEISSFLOG et al.,

1999). Diversos leucócitos participam em momentos distintos após a lesão. Imediatamente após a injúria se observam predominantemente neutrófilos (WEISSFLOG et al., 1999). Após 12 horas da ocorrência da lesão, inicia-se um predomínio de células mononucleares, como macrófagos, que participam ativamente na formação de uma rede produtora de citocinas e fatores de crescimento (que inclui, como citado anteriormente, células residentes, como o fibroblasto), coordenando as ações celulares nesta fase (WEISSFLOG et al., 1999).

Em condições onde a produção de mediadores inflamatórios, como as citocinas, está sob controle, seus efeitos são predominantemente benéficos, proporcionando importante auxílio na resolução do processo inicial de injúria. No entanto, naquelas situações em que ocorre um processo inflamatório exagerado ou descontrolado, podem advir efeitos deletérios, tanto locais quanto sistêmicos, resultando em uma perda da homeostase (HILL, 2000; TOMPKINS, 1997). Biffi et al. (1996) denominaram tal resposta de hiper-inflamatória, e citam que, quando disseminada e persistente, pode levar a imunossupressão. Weissflog et al. (1999) sugerem que dosagens de algumas citocinas, tais como o TNF- α e GM-CSF (fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos) podem identificar pacientes de risco para desenvolver complicações pós-cirúrgicas.

Os radicais livres de oxigênio são produzidos *in vivo* durante o metabolismo de células aeróbicas ou provenientes da ativação de fagócitos. São denominados também de ERO (espécies reativas de oxigênio), e quando liberados por fagócitos ativados, resultam de uma seqüência de reações bioquímicas com alto consumo de oxigênio e conhecidas como *burst* oxidativo (MASSOCO, 2003). Esses radicais livres de oxigênio quando dentro ou próximo às células, pode iniciar uma série de reações que têm efeitos irreparáveis em suas macromoléculas, tais como: lipídios, proteínas, carboidratos e até mesmo o DNA (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; MAJNO; JORIS, 2004). Sabendo-se que esses radicais são produzidos por células inflamatórias (principalmente os neutrófilos), é importante levar em consideração que se a inflamação é decorrente de um processo infeccioso, a tentativa de diminuir, ou até parar a atuação destes, torna-se sem sentido, uma vez que são a principal arma dos leucócitos; no entanto, quando a inflamação não está relacionada a um processo séptico e não é desejada, a tentativa de se parar o processo é prioritária (MAJNO; JORIS, 2004).

Portanto, em baixos níveis, as ERO podem atuar amplificando a cascata da resposta inflamatória, favorecendo assim a resposta de reparação das lesões; no entanto, quando presentes em níveis muito elevados, podem levar à lesão das células endoteliais e de outros tipos celulares, gerando mais lesão e aumentando a injúria inicial (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Os principais radicais livres de oxigênio são: o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH^-) (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; MACKAY, 2000).

Bass et al. (1983) descreveram método de mensuração da produção de radicais livres por leucócitos polimorfonucleares de sangue periférico, utilizando a técnica de citometria de fluxo e o composto 2'-7'-diclorofluoresceína diacetato (DCFH). A fluorescência resultante da oxidação do DCFH provocada pelos radicais presentes no meio intracelular é relacionada de maneira linear ao *burst* oxidativo.

A utilização da técnica de citometria de fluxo para a mensuração de *burst* oxidativo de leucócitos em eqüinos já foi descrita por diversos autores. Flaminio et al. (2000) e Raidal, Bailey e Love (1998) utilizaram a técnica de citometria de fluxo para avaliação da resposta das células ao DCFH, posteriormente, a citometria de fluxo foi aplicada por Raidal et al. (2000) para avaliar o efeito do exercício na capacidade funcional de macrófagos alveolares e linfócitos, e por Raidal, Rose e Love (2001) avaliando o efeito do treinamento na função de leucócitos circulantes e derivados de lavado broncoalveolar. Massoco e Palermo-Neto (2003) descreveram a utilização da técnica avaliando efeitos do Midazolam na função de macrófagos peritoneais e neutrófilos circulantes de eqüinos.

As citocinas, no entanto, com exceção da IL-6, que segundo Yamada et al. (1998) é um importante marcador para magnitude do trauma cirúrgico, nem sempre apresentam aumento considerável após a injúria. No entanto, sua atividade pode ser modulada por aumento nos níveis circulantes de antagonistas de seus receptores (por exemplo, antagonista de receptor de interleucina 1 – IL-1ra) e de moléculas com capacidade de quelá-las (como o receptor solúvel de TNF – sTNF-R), impedindo assim sua ação. O aumento de concentração circulante de tais moléculas durante as primeiras horas após a injúria modula então a ação das mesmas. Existem descrições de que as concentrações circulantes de IL-1ra e sTNF-R em pacientes com sepse encontram-se de trinta a cem mil vezes mais elevadas comparadas às concentrações das citocinas correspondentes (TOMPKINS, 1997). Acrescenta-se que os níveis circulantes das citocinas podem não refletir adequadamente suas

concentrações teciduais, justificando a importância da mensuração dos seus níveis locais, que no caso da cirurgia torácica, são obtidos no líquido pleural ou em tecido pulmonar (YIM et al., 2000).

2.6 AVALIAÇÃO DA INJÚRIA APÓS UMA CIRURGIA ENVOLVENDO COLAPSO PULMONAR

A utilização de técnicas cirúrgicas denominadas minimamente invasivas em substituição às técnicas cirúrgicas tradicionais é bastante discutida na medicina humana; as cirurgias abertas foram relacionadas com a ocorrência de profundas mudanças endócrinas e metabólicas, além dos efeitos nos mecanismos de defesa do organismo (KEHLET, 1999). Os primeiros estudos relacionados a esse assunto, realizados na década de 80, compararam as respostas decorrentes da utilização da laparoscopia em relação à laparotomia, observando que a laparoscopia não ocasiona importantes decorrências endócrinas e metabólicas, tendo uma reduzida resposta inflamatória (KEHLET, 1999), minimizando a dor e ocorrência de complicações no período pós operatório (YIM et al., 2000).

Segundo Shennib, Mulder e Chiu (1984), a atividade fagocítica *in vitro* de macrófagos alveolares de suínos diminui com a ocorrência do colapso pulmonar. Por outro lado, se observam níveis maiores de IL-1 e TNF- α produzidos *in vitro* por macrófagos alveolares em pulmões que sofreram colapso pulmonar (KISALA et al., 1993).

Cirino (2003) quantificou citocinas séricas e no parênquima pulmonar de ratos submetidos a colapso pulmonar em modelo experimental utilizando ELISA. Nos animais que permaneceram ventilados e com toracotomia, submetidos ao colapso pulmonar intermitente por 120 minutos, observou-se maior concentração de TNF- α tecidual do que naqueles animais que foram somente ventilados ou submetidos à ventilação e toracotomia, sem colapso pulmonar. Os animais submetidos ao colapso permanente por 120 minutos apresentaram maiores níveis de IL-6 tecidual quando comparados com aqueles que foram somente ventilados. Em relação a IL-1 tecidual, não foi observada alteração entre os animais estudados, esse resultado pode ser devido ao pico desta citocina ser após 180 minutos da injúria, ou ainda porque a

injúria em questão não constituiu um estímulo suficiente para estimular sua produção em níveis detectáveis. Já em relação ao nível sérico destas mesmas citocinas (TNF- α e IL-1), o autor não encontrou diferença significativa entre os grupos estudados. A IL-6 sérica não foi detectada através do método utilizado. O autor concluiu que em seu modelo experimental, o colapso pulmonar transitório induz reação inflamatória local sem repercussões sistêmicas.

De Smedt et al. (2004) caracterizaram a inflamação pleural após a ocorrência de pneumotórax primário espontâneo, e concluíram que a afecção está relacionada com uma importante reação inflamatória pleural, caracterizada por influxo e ativação de eosinófilos e neutrófilos no espaço pleural e por um aumento na contagem total de leucócitos circulantes, assim como um aumento significativo nos níveis de IL-5, IL-6, TNF- α , IL-12p40, e proteína ligante de LPS no lavado pleural desses pacientes.

Existem relatos de dosagem e caracterização de citocinas na espécie eqüina, porém a metodologia utilizada pelos pesquisadores é variada. Foram descritas quantificações por ensaios imunológicos (ELISA) (BERTONE; PALMER; JONES, 2001), biológicos (ARMSTRONG; LEES, 2002; GIGUERE et al., 2002; HUBERT et al., 2004) ou ainda utilizando-se técnicas de biologia molecular (KIRISAWA et al., 2006).

O edema pulmonar após a reexpansão é uma complicação observada em pacientes submetidos à cirurgia torácica (SUZUKI et al., 2002; TRACHIOTIS et al., 1997), e caracteriza-se por um processo inflamatório local agudo (SUZUKI et al., 2002), que normalmente se resolve em 24 a 72 horas. Observa-se aumento de permeabilidade do endotélio, injúrias decorrentes de isquemia e reperfusão, desbalanço de metabolismo do oxigênio, agregação e degranulação de neutrófilos e necrose tecidual mediada por radicais livres (TRACHIOTIS et al., 1997).

Tanto a presença de doença torácica de caráter maligno, quanto a natureza invasiva do procedimento cirúrgico (em menor grau), determinam o padrão de reação inflamatória subsequente à cirurgia (WEISSFLOG et al., 1999; YAMADA et al., 1998). Níveis mais baixos de TNF- α foram encontrados em pacientes submetidos à cirurgia torácica que apresentavam doença maligna em relação àqueles com doenças não malignas (WEISSFLOG et al., 1999).

Craig et al. (2001), Weissflog et al. (1999) e Yim et al. (2000) compararam a concentração de citocinas em pacientes submetidos à cirurgia videoassistida e a

toracotomia, observando menores concentrações de citocinas no período pós-operatório naqueles submetidos à cirurgia videoassistida. No entanto, segundo Kehlet (1999), apesar de existirem diferenças em relação às respostas endócrinas e imunológicas entre pacientes submetidos à cirurgia endoscópica e aqueles que passaram por cirurgias abertas, estas não são significativas. Weissflog et al. (1999) observaram que em casos de pacientes que apresentavam doença torácica maligna, esse fator influenciava os níveis de citocinas presentes no líquido pleural de uma maneira mais importante do que a injúria provocada pelo tipo de procedimento. De modo geral, a recuperação do paciente pode depender mais de uma efetiva redução da dor, de um bom programa de reabilitação e alimentação adequada, do que do tipo da cirurgia escolhida (KEHLET, 1999).

3 OBJETIVOS

- Avaliar a resposta inflamatória provocada pelo colapso pulmonar induzido por infusão controlada de CO₂ com duração de 30 ou 60 minutos (Grupo 1 e Grupo 2) em eqüinos hígidos, através da dosagem de citocinas circulantes e teciduais, assim como avaliação do *burst* oxidativo.
- Avaliar ocorrência de pneumotórax residual após reversão do colapso pulmonar.
- Avaliar a pressão intratorácica pré e pós colapso pulmonar.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Para a realização deste trabalho foram utilizados doze eqüinos (nove machos e três fêmeas), de raça e idade variáveis, alojados no Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Foram selecionados somente animais considerados clinicamente sadios e sem histórico de afecção intratorácica prévia, sendo seis locados no grupo 1 e seis no grupo 2.

Assim como citado anteriormente, os animais do grupo 1 foram submetidos a um colapso pulmonar de 30 minutos de duração e os do grupo 2 de 60 minutos, o protocolo experimental para ambos os grupos se manteve o mesmo, diferindo somente o tempo cirúrgico e de duração da sedação para que o procedimento se tornasse possível.

Um dos animais submetidos ao procedimento cirúrgico (animal número 6) foi retirado do protocolo durante a coleta do momento 6 (2 horas após o início do pneumotórax) devido a problemas comportamentais. Os dados referentes à raça, sexo, idade e peso dos animais (denominados 1 a 12), estão relacionados no apêndice A – quadro 1.

Ao ingressarem no setor, os animais foram submetidos a exame clínico e vermifugados com moxidectina¹ e quando necessário, realizado controle de ectoparasitas com deltametrina². No período em que permaneceram alojados no Departamento, receberam água à vontade, feno de “coast-cross” como volumoso e 500 gramas de concentrado de ração peletizada comercial³, ambos duas vezes ao dia.

¹ Equest® - Fort Dodge Animal Health

² BUTOX® P CE 25 - Intervet Brasil

³ Ração Triumph Rodeio® - Socil

4.2 EQUIPAMENTOS

4.2.1 Cirurgia torácica videoassistida

Para realização da cirurgia torácica videoassistida foram utilizados

- Óptica rígida de 30cm de comprimento com 10mm de diâmetro e 0° de ângulo de visão, marca *ASAP*⁴.
- Cabo de fibra óptica de 200cm de comprimento, marca *ASAP*⁴.
- Cânula de 10,5cm de comprimento e 10mm de diâmetro, modelo Endo TIP[®], marca *KARL STÖRZ*⁴ (Figura 1).
- Monitor modelo Trinitron PVM-14N2E, marca *SONY*⁴ (Figura 2).
- Processadora de imagem, modelo Telecam-DX NTSC, marca *KARL STÖRZ*⁴ (Figura 2).
- Vídeo câmera – 30mm, modelo Telecam-C NTSC, marca *KARL STÖRZ*⁴ (Figura 2).
- Fonte luminosa de xenônio, modelo Nova, marca *KARL STÖRZ*⁴ (Figura 2).
- Insuflador automático de CO₂ aquecido da marca Wisap^{®4} (Figura 2).
- Aspirador, modelo Aspira Max MA-520, marca NS-INDÚSTRIA DE APARELHOS MÉDICOS LTDA⁴.

Figura 1 – Cânula modelo Endo Tip[®]; A: em detalhe extremidade distal

⁴ Equipamento fornecido pelo Serviço de Cirurgia de Grandes Animais da FMVZ/USP

Figura 2 - Imagem digitalizada do trole com equipamento de videoendoscopia: M: monitor; I: impressora térmica; F: fonte luz; P: processadora de imagem; In: insuflador

4.2.2 Lavado broncoalveolar

- Gastroscópio para grandes animais - modelo vet - scope 3000^{®4}.
- sonda.

4.2.3 Toracocentese

- Cânula mamária de 6 cm de comprimento.

4.2.4 Avaliação do pneumotórax residual

- Aparelho para Raio-x modelo *Simens Nanodor 1* de 75 kV e 18 mA com controle de tempo de 0,10s a 5,0s⁴.

- Filme para RX Kodak T-MAT G/RA 35 X 43.

4.2.5 Citometria de fluxo

- Citômetro de fluxo (*Becton Dickinson Immunocytometry System, San Jose, CA, USA*)⁵.
- *Software Cell Quest Pro*.
- Estação de trabalho (Computador *Apple, Macintosh G4, CA, USA*)⁵.
- Centrífuga refrigerada Harrier 18/80⁵.

4.2.6 Hemogasometria

- Aparelho de hemogasometria e eletrólitos – Omni – AVL Modular System Roche^{6®}.
- Aparelho de hemogasometria - ABL5 - Radiometer^{7®}.

4.2.7 Leucograma

- Contador hematológico automático *Serono Diagnostics Modelo System 9020*⁶.

4.2.8 Determinação do TNF- α , IL-1 β e IL-6

- Leitor automático de oito canais *MCC/340 Titertek Instruments, AL, EUA*⁵.

⁵ Equipamento fornecido pelo Departamento de Patologia da FMVZ/USP

⁶ Equipamento pertencente ao Departamento de Clínica Médica da FMVZ/USP

⁷ Equipamento pertencente ao Departamento de Cirurgia da FMVZ/USP

4.3 MÉTODOS

4.3.1 Delineamento experimental

Os seguintes momentos experimentais foram definidos:

M1 – pré-operatório.

M2 – início do colapso pulmonar.

M3 – trans-operatório (15 minutos para o grupo 1 e 30 minutos para o grupo 2).

M4 – fim do colapso pulmonar.

M5 – fim do procedimento cirúrgico/ pós-operatório imediato.

M6 – duas horas após o início do colapso pulmonar.

M7 – seis horas após o início do colapso pulmonar.

M8 – 24 horas após o início do colapso pulmonar.

4.3.2 Exame clínico

Foi realizado exame clínico, com avaliação das seguintes variáveis fisiológicas: frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura corpórea dos animais nos momentos experimentais 1, 3, 5 e 8.

4.3.3 Coleta de sangue venoso e arterial

O sangue venoso foi coletado da veia jugular dos animais diretamente para tubos com vácuo⁸ contendo anticoagulante, sendo este EDTA para realização do hemograma e heparina sódica para avaliação do *burst* oxidativo.

⁸ Vacutainer® Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA

O sangue arterial foi coletado da artéria facial dos animais em seringa heparinizada e acondicionado em banho de gelo até a realização da hemogasometria.

4.3.4 Protocolo anestésico

Os animais foram submetidos a jejum alimentar de 12 horas, não sendo submetidos à restrição hídrica. O protocolo anestésico utilizado foi: 0,5mg/kg de Xilazina⁹ associada a 0,04 mg/kg de Tartarato de Butorfanol¹⁰ seguido de anestesia local infiltrativa com 20 ml de lidocaína a 2%¹¹ no local escolhido para o acesso cirúrgico. O protocolo de sedação foi repetido conforme a necessidade durante as coletas do líquido pleural e realização do lavado broncoalveolar.

A analgesia no período pós-operatório foi realizada com Meperidina¹², na dose de 1,1mg/kg por via intramuscular.

4.3.5 Lavado broncoalveolar

Realizou-se por meio de broncoscopia utilizando-se o canal de trabalho do gastroscópio para eqüinos, modelo Vet - Scope 3000[®] para passagem da sonda acessória¹³ e coleta do material nos momentos experimentais M1, M6, M7 e M8. Foi utilizada solução salina tamponada com fosfatos (PBS) estéril e com esta realizadas 4 instilações de 60mL, representando um volume total de 240mL de solução. As figuras 3 e 4 correspondem ao momento da realização do lavado broncoalveolar.

⁹ Sedazine[®] - Fort Dodge Animal Health, Campinas, SP

¹⁰ Torbugesic[®] - Fort Dodge Animal Health, Campinas, SP

¹¹ Cloridrato de Lidocaína 2% - Laboratório Hipolabor, Borges Sabará, MG

¹² Dolosal[®] - Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Itapira, SP

¹³ Montag[®] São Paulo, SP

Figura 3 – Representação do método utilizado para realização do lavado broncoalveolar. A: visualização da carina, bd: brônquio direito, be: brônquio esquerdo; B: visualização do brônquio esquerdo (be); C: introdução da sonda (s) no brônquio esquerdo; D: momento da lavagem no brônquio esquerdo

Figura 4 – Lavado broncoalveolar esquerdo. Momento da instilação e recuperação do PBS (pbs)

O líquido recuperado foi avaliado macroscopicamente quanto ao aspecto e volume. O lavado foi acondicionado em tubos plásticos estéreis e mantidos em banho de gelo para análise posterior.

4.3.6 Toracocentese

A coleta do líquido pleural foi realizada nos momentos experimentais M1, M6, M7 e M8, conforme a técnica descrita por Bennett (1986) e Cowell et al. (1987), utilizando-se cânula mamária de aço inoxidável.

Após realização do protocolo anestésico, os animais foram colocados em tronco de contenção, e realizada antissepsia com clorexidine¹⁴ na região do 6º e 7º espaços intercostais acima da veia torácica. Seguiu-se a realização da anestesia local infiltrativa com 5mL de lidocaina 2%. Após realizou-se incisão de pele de 0,5cm e divulsão de tecido subcutâneo com auxílio de pinça do tipo Crile. A cânula mamária foi acoplada a uma torneira de três vias, preenchida com solução heparinizada e introduzida na cavidade torácica. Uma seringa de 20mL foi então acoplada e procedeu-se a realização da aspiração do líquido. O líquido pleural coletado foi avaliado quanto ao aspecto e volume e a seguir acondicionado em tubos plásticos estéreis em banho de gelo para posterior análise (Figura 5). A pele foi suturada com um ponto em “X” com fio de náilon 2.0¹⁵. Esse ponto foi retirado em cada um dos momentos de coleta para que não fosse necessária a realização de novas incisões.

Figura 5 – A: Realização da toracocentese no 6º espaço intercostal esquerdo; B: no detalhe: torneira de três vias (t); seringa de 20mL (s) e aspecto do líquido coletado (l)

¹⁴ Chlorohex® - Gluconato de clorexidina 2% degermante; Vicpharma Indústria e comércio LTDA, Indaiatuba, SP, Brasil

¹⁵ Mononylon – Ethicon – Johnson & Johnson, São José dos Campos, SP

4.3.7 Toracoscopia

A toracoscopia foi realizada com auxílio da técnica de introdução assistida da cânula, pois esta permite o acesso seguro à cavidade torácica, prevenindo a ocorrência de lesões que poderiam interferir no estudo em questão, além de possibilitar a visualização das estruturas, no momento do acesso à cavidade torácica.

Após ampla tricotomia da região do gradil costal esquerdo e anti-sepsia com clorexidine, foi abordado o décimo espaço intercostal. Realizou-se incisão de pele e fáscia muscular de 4cm, e introduziu-se a cânula de maneira assistida, que através de movimentos de rotação permitiu o acompanhamento da divulsão romba dos planos musculares, fáscia endotorácica e pleura costal (Figura 6). No momento em que a pleura costal foi rompida, mensurou-se a pressão intratorácica inicial e então se instalou gradativamente o pneumotórax, com conseqüente colapso pulmonar, utilizando-se um insuflador automático de gás CO₂ aquecido.

Figura 6 – Introdução assistida da cânula modelo Endo Tip® na cavidade torácica. A: introdução da cânula, onde p: parede interna da cânula e s: tecido subcutâneo; B: início da divulsão romba dos planos musculares, onde p: parede interna da cânula e me: músculo intercostal externo; C: visualização músculo intercostal interno (mi) e pleura parietal (pp); D: Momento da ruptura da pleura parietal (pp) e visualização da superfície pulmonar (sp)

O pneumotórax foi considerado ideal quando as seguintes estruturas foram evidenciadas: porção muscular e tendínea do músculo diafragma, hiato esofágico, mediastino, tronco dorsal e ventral do nervo vago, veias intercostais, aorta, músculos intercostais, costelas, pulmão (lobo cranial e caudal) e esôfago.

O pneumotórax foi então mantido por 30 ou 60 minutos, nos grupos 1 e 2, respectivamente. Durante esse tempo, a região dorso caudal do tórax foi periodicamente avaliada, permitindo diagnóstico precoce de pneumotórax bilateral. Caso o mesmo ocorresse, se realizava aspiração do ar intratorácico, permitindo então a insuflação pulmonar mesmo que não completa, e impedindo a ocorrência de desconforto respiratório mesmo na vigência do pneumotórax bilateral.

Ao fim de cada um dos procedimentos o ar intratorácico foi retirado com auxílio de um aspirador cirúrgico, acoplado à cânula. No momento em que o bordo pulmonar atingia a ponta da cânula, era mensurada a pressão intratorácica final, e a cânula retirada através de movimentos rotativos. A musculatura foi suturada em ponto em “X” com fio de náilon 2.0, e a pele suturada em ponto simples separado com fio de náilon 2-0.

4.3.8 Avaliação radiográfica para verificação da ocorrência de pneumotórax residual

Foi realizado exame radiográfico utilizando-se chassís de alumínio com Ecran carregado com filme para raio-X¹⁶, tamanho 35x43cm nos momentos experimentais 1 (controle pré-operatório) e 5 (pós-operatório imediato), objetivando-se avaliar a ocorrência de pneumotórax residual. Esse exame foi repetido 24 horas após o procedimento, nos casos em que no período pós-operatório imediato foi observada a ocorrência de pneumotórax residual.

¹⁶ Kodak T-MAT G/RA Film tamanho 35x43

4.3.9 Avaliação laboratorial

4.3.9.1 Mensuração do *Burst* Oxidativo

O *burst* oxidativo foi mensurado conforme o método proposto por (HASUI; HIRABAYASHI; KOBAYASHI, 1989) utilizando-se a técnica de citometria de fluxo nas amostras de sangue, líquido pleural e lavado broncoalveolar. Após a contagem celular para as amostras de líquido pleural e do LBA foram preparados 2 tubos de polipropileno (tubos A e B), contendo 2×10^4 células e PBS q.s.p. 1 mL (tubo A) ou 2×10^4 células mais 200 μ L de DCFH (0,3 mM) e PBS q.s.p. 1 mL (tubo B). O mesmo esquema de tubos preparados anteriormente foi repetido para as amostras de sangue, colocando-se, no entanto, 100 μ L de sangue. As amostras, tanto de sangue, como do líquido pleural ou LBA, foram colocadas para incubação em banho-maria sob agitação a 37°C por 20 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1200rpm e os eritrócitos foram removidos dos botões de leucócitos formados por lise hipotônica com uma solução de NaCl 0,2% (2,0ml) durante 20 segundos. Imediatamente após esta lise, a isotonicidade das amostras foi restaurada adicionando-se uma solução de NaCl 1,6% (2,0mL). As amostras foram centrifugadas novamente e a lise foi repetida. Os botões celulares foram então ressuspensos adicionando-se aos tubos 500 μ L de PBS resfriado. Foi então realizada a mensuração do *burst* oxidativo por citometria de fluxo, sendo o tubo A considerado como controle não fluorescente.

Utilizou-se citômetro de fluxo conectado a computador. Foram analisados 10.000 eventos utilizando-se o software *Cell Quest Pro*¹⁷. As subpopulações celulares foram identificadas por meio das suas propriedades em gráficos FSC/SSC e os resultados de fluorescência foram adquiridos em escala logarítmica.

Após a aquisição dos dados, estes foram analisados com auxílio do programa *Flow Jo*¹⁸. A quantificação do *burst* oxidativo foi estimada pela intensidade média de fluorescência emitida pelo DCFH (detector FL-1) em cada uma das populações celulares

¹⁷ Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA

¹⁸ FlowJo® para Windows, versão 7 (<http://www.flowjo.com>)

4.3.9.2 Mensuração da IL-1 β

A quantificação de IL-1 β foi realizada utilizando-se kit comercial de ELISA para IL-1 β humana (Cayman, USA) nas amostras de plasma e sobrenadantes de líquido pleural e lavado broncoalveolar nos momentos experimentais 1, 6, 7 e 8. Para a realização dos ensaios foi seguida a metodologia recomendada pelo fabricante.

4.3.9.3 Mensuração da IL-6

A atividade biológica de IL-6 foi avaliada conforme descrito anteriormente por (ARMSTRONG; LEES, 2002), em amostras de plasma e sobrenadantes de líquido pleural e lavado broncoalveolar nos momentos experimentais 1, 6, 7 e 8, a partir do crescimento das células da linhagem B9, cuja proliferação é dependente de IL-6. Células do hibridoma B9 foram cultivadas em RPMI contendo L-glutamina, piruvato, antibióticos e antifúngicos, 2-mercaptoetanol (5×10^{-5} M), IL-6 recombinante murino (rIL-6 – 50 pg/ml) e 10% de soro fetal bovino (chamado então de meio B9). As células foram centrifugadas duas vezes em meio B9 sem rIL-6, sua concentração ajustada para 2×10^4 células por mL, e 100 μ L desta suspensão foram cultivados por 72h a 37°C em placas de 96 poços, com 10 μ L de diluições variadas das amostras. A proliferação das células B9 foi avaliada por meio de um ensaio com MTT, conforme descrito anteriormente. Os valores de absorbância foram avaliados por comparação com uma curva padrão de rIL-6 e os valores de IL-6 foram então interpolados a partir desta. Os valores foram expressos em pg/mL e estimados para a espécie eqüina, uma vez que foi utilizada como padrão, IL-6 recombinante murino.

4.3.9.4 Mensuração do TNF- α

A quantificação do TNF- α foi realizada através de ensaio de citotoxicidade *in vitro* sobre células L929, conforme descrito por Flick e Gifford (1984) nas amostras

de plasma e sobrenadantes de líquido pleural e lavado broncoalveolar nos momentos experimentais 1, 6, 7 e 8.

Em uma placa de poliestireno de 96 poços com fundo chato foram semeadas $3,5 \times 10^5$ células L929, suspensas em 100mL de meio RPMI 1640 completo suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB). A placa foi incubada por 20 horas em estufa umidificada à 37°C na presença de 5% de CO₂. Após este período, foram adicionados aos poços 100μL das amostras e 10μL de actinomicina D (2μg/ml). A placa foi então incubada novamente, em estufa umidificada à 37°C na presença de 5% de CO₂ por mais 20 horas. Após este período, as células remanescentes na placa (células viáveis) foram fixadas e coradas com 10μL por poço de cristal violeta diluído a 0,5% em ácido acético a 30%. Decorridos 15 minutos lavou-se a placa em água corrente eliminando o excesso de cristal violeta; a secagem foi feita à temperatura ambiente. O cristal violeta depositado nas células viáveis foi dissolvido com 100mL de metanol. Foi então avaliado a concentração de TNF-α fazendo-se a leitura de absorbância em leitor de microplacas automático de oito canais, utilizando-se 620nm como comprimento de onda contra um branco constituído apenas por meio RPMI 1640 completo.

Como controle negativo do ensaio foi adicionado às células L929 apenas meio RPMI 1640 completo. Como controle positivo foram utilizadas concentrações conhecidas de TNF-α recombinante murino (5000, 2500, 1250, 625, 312.5, 156.25, 78.12, 39.0, 19.5, 9.0 pg de TNF-α/ 100μL solução de RPMI 1640 completo) de forma a permitir a obtenção de uma curva padrão. O procedimento foi feito sempre em duplicata e os resultados obtidos após a leitura em leitor de microplacas foram expressos inicialmente em densidade óptica (D.O.), e transformados em pg/mL, mediante equação de regressão linear com base na curva padrão em duplicatas. Os valores obtidos em pg/mL são estimados para a espécie eqüina, uma vez que utilizou-se como padrão TNF-α recombinante murino.

4.3.9.5 Avaliação do leucograma e dosagem de fibrinogênio

O leucograma foi realizado em contador hematológico automático nos momentos experimentais 1 e 8, e a contagem diferencial de leucócitos foi realizada

em extensões sanguíneas utilizando-se 100 células. Para a dosagem do fibrinogênio plasmático expressa em g/dL foi utilizada a técnica de precipitação em banho-maria a 56°C.

4.3.9.6 Avaliação da hemogasometria

Foi realizada nos momentos experimentais 1, 5 e 8, utilizando-se aparelho automático de hemogasometria e eletrólitos. Foram analisadas as seguintes variáveis: pH, PaCO₂, PaO₂ e SaO₂.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a interpretação dos resultados obtidos nos experimentos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias, paramétrica, avaliando simultaneamente os efeitos relacionados à duração do pneumotórax e aos momentos de coleta das amostras, assim como a influência da interação de ambos os fatores nos parâmetros estudados. Nos casos em que as variáveis não apresentavam uma distribuição normal, foi realizado o ranqueamento dos valores e o teste foi então repetido. Quando a ANOVA de duas vias mostrou diferença entre os parâmetros analisados, foi aplicado o teste de Holm-Sidak de comparações múltiplas. Para a realização dos testes foram utilizados programas de computador¹⁹. O limite de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$). Os dados foram apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão da média.

¹⁹ GraphPad Prism 3.0 e SigmaStat 3.0

5 RESULTADOS

5.1 EXAME CLÍNICO

5.1.1 Freqüência cardíaca

Foi observada influência estatisticamente significativa do fator grupo experimental nos valores de freqüência cardíaca obtidos durante o protocolo experimental ($F_{1,46} = 9,24$ e $p = 0,004$) (Gráfico 1).

Após a realização do teste de comparações múltiplas, analisando-se separadamente cada momento experimental, foi observada diferença entre os dois grupos experimentais somente no momento 3 ($p = 0,035$) (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Representação gráfica dos valores médios e EPM de freqüência cardíaca (batimentos cardíacos por minuto) apresentados pelos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2005

5.1.2 Frequência respiratória

Não foi observada influência dos fatores avaliados nos valores de frequência respiratória apresentados pelos animais durante o protocolo experimental descrito (Gráfico 2).

Gráfico 2 – Representação gráfica dos valores médios e EPM de frequência respiratória (movimentos respiratórios por minuto) apresentados pelos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2005

5.1.3 Temperatura corpórea

Foi observada influência estatisticamente significativa do fator grupo experimental ($F_{1,42} = 6,212$ e $p = 0,018$), assim como da interação dos fatores grupo e momento experimental ($F_{3,42} = 7,231$ e $p < 0,001$) nos valores de temperatura corpórea apresentados pelos animais durante o protocolo experimental (Gráfico 3).

Quando aplicado teste de Holm-Sidak, de comparações múltiplas para analisar isoladamente cada grupo experimental, não foram observadas diferenças entre os momentos experimentais no grupo 1, no entanto, no grupo experimental 2,

M1 diferiu de M3 ($p < 0,001$), M5 ($p < 0,001$) e M8 ($p = 0,048$); M8 diferiu de M3 ($p = 0,014$) e M5 ($p = 0,029$) (Gráfico 3).

Analisando-se cada momento experimental utilizando-se o mesmo teste, observou-se diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos experimentais em M1 ($p = 0,027$), M3 ($p = 0,003$) e M5 ($p = 0,003$) (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Representação gráfica dos valores médios e EPM de temperatura (°C) apresentados pelos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2005

5.2 PROTOCOLO ANESTÉSICO

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, a associação de 0,5mg/kg de Xilazina associado a 0,04 mg/kg de Tartarato de Butorfanol seguido de anestesia local infiltrativa com lidocaína a 2% mostrou-se adequada, permitindo a intervenção; foram necessárias uma reaplicação nos animais do grupo 1 e duas nos animais do grupo 2.

Em relação ao lavado broncoalveolar, a utilização do protocolo se fez necessária, uma vez que a técnica provoca desconforto na maioria dos animais, o que adiciona risco ao animal e à equipe que o está manipulando. Os primeiros

animais utilizados se mostraram intolerantes ao procedimento quando foram utilizadas doses mais baixas para sua sedação, portanto, adicionou-se ao protocolo de colheita a realização da sedação na mesma dose utilizada no procedimento cirúrgico. Desta maneira, a toracocentese passou a ser realizada imediatamente após o lavado broncoalveolar, utilizando a sedação descrita acima.

5.3 LAVADO BRONCOALVEOLAR

A técnica utilizada nesse trabalho, descrita no item 4.3.5 permitiu a realização direcionada do lavado broncoalveolar.

Uma vez que se faz necessária a instilação de grandes volumes de solução para a realização do lavado, esse provoca desconforto nos animais, necessitando portanto, para sua realização, de uma sedação intensa e contenção física do animal. Por esse mesmo motivo, a realização de coletas seriadas mostrou-se complicada, incorrendo em muitas reaplicações de drogas sedativas em curtos intervalos de tempo e intensa manipulação do animal.

Para a realização dessa técnica, uma equipe de no mínimo seis pessoas foi mobilizada, sendo uma responsável pela contenção física, uma para a passagem do gastroscópio, duas para a manipulação e direcionamento do aparelho, uma para instilação e recuperação da solução, e uma para a manipulação da amostra.

O correto direcionamento do aparelho para um brônquio secundário permitiu a recuperação de um lavado de qualidade, isto é, apresentando ligeira turbidez e presença de surfactante.

Não foram observadas influências estatisticamente significantes das variáveis empregadas (duração do procedimento ou momento de coleta) no volume de lavado broncoalveolar recuperado (Gráfico 4).

Gráfico 4 – Representação gráfica dos valores médios e EPM do volume dos lavados broncoalveolares recuperados nos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2005

Em alguns animais obtivemos lavados com contaminação sanguínea: três animais no momento 1, resultando em coletas contaminadas em um deles no restante do protocolo. Um animal no momento 7, também resultando em coleta contaminada no momento seguinte, e em um animal no momento 8.

O animal 7 apresentou nas coletas dos momentos 6 e 8, um lavado com coloração amarelada, provavelmente com causa pré-existente não relacionada ao procedimento cirúrgico, e sem apresentar manifestações clínicas ou alterações nos parâmetros hematológicos e radiográficos no momento experimental 1 que pudessem classificá-lo como não hígido. O apêndice B contém as informações referentes às características dos lavados broncoalveolares obtidos nos diferentes momentos experimentais em cada um dos animais.

5.4 TORACOCENTESE

A técnica utilizada nesse trabalho se mostrou adequada e eficaz no acesso à cavidade pleural de eqüinos, visto que os animais sob sedação e anestesia local toleraram bem o procedimento.

Das toracocenteses realizadas, três foram consideradas improdutivas, impossibilitando coleta de amostra suficiente para análise.

O direcionamento por meio de exame ultra-sonográfico não foi necessário. Seguindo-se a orientação anatômica descrita anteriormente, foi possível acessar a cavidade torácica e realizar a coleta de líquido pleural.

Não foram observadas influências estatisticamente significantes dos fatores avaliados no volume de líquido pleural recuperado (Figura 11).

Gráfico 5 – Representação gráfica dos valores médios e EPM do volume de líquido pleural obtido por toracocentese dos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2005

Alguns animais apresentaram edema no local da toracocentese, nestes casos em que tal edema ainda estava presente em M8 era administrado fenilbutazona²⁰, na dose única de 4,4mg/kg, uma vez que neste momento os animais já estavam fora do cronograma de coletas.

²⁰ Equipalazone® - Marcolab, Rio de Janeiro, RJ

5.5 TORACOSCOPIA

Na técnica de toracoscopia, o acesso à cavidade torácica de maneira assistida utilizando-se a cânula se mostrou adequado para a realização deste trabalho, no qual se fazia necessário o controle do pneumotórax. Embora a técnica seja considerada bastante segura, em um dos animais ocorreu um grau leve de laceração pulmonar no momento da introdução da cânula e acesso à cavidade torácica. A intensidade do colapso pulmonar caracterizado como ideal (Figura 7) é adequada e possibilita a realização de procedimentos, sejam de caráter diagnóstico ou terapêuticos.

Figura 7 – Pneumotórax considerado ideal, onde se visualiza em c: costelas; m: músculos intercostais; p: pulmão esquerdo colabado; a: artéria aorta e v: ramo dorsal do nervo vago – São Paulo - 2005

Não foram observadas influências estatisticamente significativas dos fatores avaliados nas pressões intratorácicas (PIT) mensuradas (inspiratória ou expiratória).

Os gráficos 6 e 7 apresentam os valores das pressões intratorácicas iniciais e finais obtidas nos procedimentos.

Gráfico 6 – Representação gráfica dos valores médios e EPM da diferença de pressões intratorácicas (PIT) inspiratórias (mmHg) em relação à pressão ambiental mensurada nos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2005

Gráfico 7 – Representação gráfica dos valores médios e EPM da diferença de pressões intratorácicas (PIT) expiratórias (mmHg) em relação à pressão ambiental mensurada nos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2005

5.6 OCORRÊNCIA DE PNEUMOTÓRAX BILATERAL

Observamos a ocorrência de pneumotórax bilateral em dois animais do grupo 2 (9 e 11), em ambos diagnosticado visualmente após 50 minutos de duração do

colapso pulmonar (Figura 8). Foi realizada aspiração de quantidade suficiente de CO₂ para que fosse possível uma maior expansão pulmonar, e conseqüentemente conforto respiratório do animal, sem que fosse necessário reverter o pneumotórax, o que alteraria, portanto, o delineamento experimental. Depois de decorridos os 60 minutos pré-determinados foi realizada a aspiração assistida do gás da cavidade torácica, assim como realizado nos outros animais. A figura 9 representa a ausência de pneumotórax bilateral.

Figura 8 – Visualização da pleura mediastínica (pm) com a ausência do pulmão direito por transparência, durante o procedimento de toracoscopia. a: artéria aorta – São Paulo - 2005

Figura 9 – Visualização da pleura mediastínica (pm) com a presença do pulmão direito por transparência, durante o procedimento de toracoscopia. a: artéria aorta – São Paulo - 2005

5.7 AVALIAÇÃO RADIOGRÁFICA DO PNEUMOTÓRAX RESIDUAL

Não foi observada a ocorrência de pneumotórax residual em animais do grupo 1 (Figura 10). Já no grupo 2, três animais apresentaram pneumotórax residual (Figura 11), sendo eles:

- Animais 9 e 11- pneumotórax residual hemitórax direito e lado esquerdo.
- Animal 10 - discreto pneumotórax residual no hemitorax esquerdo.

Figura 10 – Imagem radiográfica do hemitórax esquerdo, onde se nota ausência de pneumotórax residual. Exame realizado no período pós-operatório imediato (Momento 5) do animal 1 do grupo 1 – São Paulo – 2005

Figura 11 – A: Imagem radiográfica do hemitórax esquerdo, onde se nota presença de pneumotórax residual. B: destaque do bordo pulmonar. Exame realizado no período pós-operatório imediato (Momento 5) do animal 9 do grupo 2 – São Paulo – 2005

O animal número 11, alocado no grupo experimental 2, apresentou no período pós-operatório desconforto respiratório que foi atribuído ao pneumotórax residual no lado direito. O CO₂ da cavidade torácica foi então aspirado com o auxílio do mesmo aspirador cirúrgico utilizado no restabelecimento da pressão intratorácica. Esse procedimento reverteu satisfatoriamente o quadro, tornando possível o retorno do animal ao protocolo experimental nos momentos subseqüentes.

5.8 AVALIAÇÃO LABORATORIAL

5.8.1 *Burst oxidativo*

Cada uma das amostras de sangue, lavado broncoalveolar ou líquido pleural, coletadas nos momentos experimentais foi processada conforme descrição do item 4.3.9.1 e representada em citogramas, ilustrando os dados relativos às propriedades SSC e FSH das populações celulares. Os gráficos 8 a 10 representam os citogramas destas amostras nos momentos experimentais 1, 6, 7 e 8.

Gráfico 8 – Citogramas ilustrando os dados relativos às propriedades SSC e FSH de leucócitos circulantes do sangue nos momentos experimentais 1 (A), 6 (B), 7 (C) e 8 (D). (a) representa a população de leucócitos analisada – São Paulo – 2005

Gráfico 9 – Citogramas ilustrando os dados relativos às propriedades SSC e FSH de leucócitos presentes no líquido pleural nos momentos experimentais 1 (A), 6 (B), 7 (C) e 8 (D). (a) representa a população de leucócitos analisada – São Paulo – 2005

Gráfico 10 – Citogramas ilustrando os dados relativos às propriedades SSC e FSH de leucócitos presentes no lavado broncoalveolar nos momentos experimentais 1 (A), 6 (B), 7 (C) e 8 (D). (a) representa a população de leucócitos analisada – São Paulo – 2005

Foram isoladas em regiões distintas as populações celulares que emitiam fluorescência. No sangue e no líquido pleural analisamos somente a população de polimorfonucleares neutrófilos. Já no lavado broncoalveolar, foram analisadas em conjunto as populações de polimorfonucleares neutrófilos e mononucleares.

Podemos observar nos citogramas, uma alteração na disposição e concentração de células que constituíram a população analisada.

Na avaliação do *burst* oxidativo, foram analisados os valores de intensidade média de fluorescência em FL-1 das populações celulares em cada uma das amostras (Gráfico 11).

Gráfico 11 – A: *Dot Plot* de análise em citômetro de fluxo de amostra de sangue obtido no Momento 1, identificação da população celular de interesse (a). B: Histograma de análise (número de células por intensidade de fluorescência FL-1) da população evidenciada em A – São Paulo – 2006

No líquido pleural (Gráfico 12) e no lavado broncoalveolar (Gráfico 13), não foi observada influência dos fatores analisados nos valores médios de fluorescência produzida pela população celular.

Gráfico 12 – Representação gráfica dos valores médios e EPM da intensidade de fluorescência emitida por neutrófilos mensurada por citometria de fluxo no líquido pleural dos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2006

Gráfico 13 – Representação gráfica dos valores médios e EPM da intensidade de fluorescência emitida por leucócitos mensurada por citometria de fluxo no líquido pleural dos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2006

Já quando analisados os valores de fluorescência produzidos pelos leucócitos circulantes, foi observada uma influência estatisticamente significativa do grupo experimental nos valores médios de fluorescência produzida pelos neutrófilos circulantes ($F_{1,36} = 6,675$ e $p = 0,013$), mostrando que existe uma diferença nos valores de fluorescência produzida pelos neutrófilos circulantes entre os dois grupos. O teste de Holm-Sidak revelou diferença estatisticamente significativa entre os momentos experimentais 1 e 8 ($p = 0,009$) quando analisados globalmente, porém não foi observada diferença entre os grupos em nenhum dos momentos experimentais (Gráfico 14).

Gráfico 14 – Representação gráfica dos valores médios e EPM da intensidade de fluorescência emitida por neutrófilos mensurada por citometria de fluxo no sangue dos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2006

5.8.2 Níveis de IL-1 β

Conforme descrito no item 4.3.9.1, foram determinados os níveis de IL-1 β nas amostras de plasma e sobrenadantes do líquido pleural e do lavado broncoalveolar.

Não foi possível realizar análise estatística dos dados obtidos pelo ensaio com amostras de líquido pleural, uma vez que a maior parte apresentou valores abaixo do limiar de detecção do teste.

Das 38 amostras de líquido pleural analisadas, obtivemos apenas quatro valores positivos, sendo eles: 6,59 pg/mL em M8 do animal 1 alocado no grupo 1; 4,49 pg/mL em M8 do animal 3 alocado no grupo 1; 26,66 pg/mL em M7 do animal 4 alocado no grupo 1 e 2,10 pg/mL em M7 do animal 7 alocado no grupo 2.

5.8.3 Níveis de IL-6

Conforme descrito no item 4.3.9.2, foram determinados os níveis de IL-6 nas amostras de plasma e sobrenadantes do líquido pleural e do lavado broncoalveolar.

Foi observada uma influência estatisticamente significativa do momento experimental nos níveis plasmáticos de IL-6 ($F_{3,35} = 3,144$ e $p = 0,037$). Após a realização do teste de comparações múltiplas de Holm-Sidak, foi observada diferença entre M8 e M1 ($p = 0,017$), M6 ($p = 0,020$) e M7 ($p = 0,015$). Quando analisados os grupos isoladamente, somente foi observada diferença estatisticamente significativa entre M7 e M8 no grupo 1 ($p = 0,015$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais em cada um dos momentos (Gráfico 15).

Gráfico 15 – Representação gráfica dos valores médios e EPM dos níveis de IL-6 plasmáticos (pg/mL) dos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2006

Da mesma maneira, foi observada influência significativa do fator momento experimental nos níveis de IL-6 no sobrenadante do LBA ($F_{3,35} = 4,506$ e $p = 0,009$). Foi observada diferença estatisticamente significativa entre os níveis de IL-6 entre os momentos experimentais M1 e M6 ($p = 0,010$) e M7 ($p = 0,009$) e entre M7 e M8 ($p = 0,013$) (Gráfico 16).

Quando os grupos experimentais foram analisados isoladamente, em ambos foi observada diferença estatisticamente significativa entre M1 e M7 (com $p = 0,009$ nos dois grupos). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos experimentais em cada um dos momentos (Gráfico 16).

Níveis de Interleucina 6 no Lavado broncoalveolar

Gráfico 16 – Representação gráfica dos valores médios e EPM dos níveis de IL-6 no lavado broncoalveolar (pg/mL) dos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2006

Em relação aos níveis de IL-6 no sobrenadante do líquido pleural, foi observada influência significativa do grupo ($F_{1,25} = 6,628$ e $p = 0,016$) e do momento experimental ($F_{3,25} = 39,705$ e $p < 0,001$). Quando analisados os diferentes momentos experimentais, foi observado que M1 diferiu de M6 ($p = 0,006$), de M7 ($p < 0,001$) e de M8 ($p < 0,001$); M6 diferiu de M7 ($p < 0,001$) e de M8 ($p < 0,001$) e M7 diferiu de M8 ($p = 0,004$) (Gráfico 17).

Quando cada grupo experimental foi analisado isoladamente, tanto no grupo 1 quanto no 2 todos os momentos diferiram um do outro, exceto M1 e M6 no grupo 2. Desta maneira, no grupo 1 foi observada diferença entre M1 e M6 ($p = 0,024$), M7 ($p < 0,001$) e M8 ($p < 0,001$); entre M6 e M7 ($p < 0,001$) e M8 ($p < 0,001$) e entre M7 e M8 ($p = 0,004$). No grupo 2, M1 diferiu de M7 ($p < 0,001$) e de M8 ($p < 0,001$); M6 de M7 ($p = 0,010$) e de M8 ($p < 0,001$) e M7 de M8 ($p = 0,044$) (Gráfico 17).

Analisando-se os diversos momentos experimentais, foi observada diferença significativa entre os grupos experimentais 1 e 2 em M7 ($p = 0,027$) e M8 ($p = 0,016$) (Gráfico 17).

Gráfico 17 – Representação gráfica dos valores médios e EPM dos níveis de IL-6 no líquido pleural (pg/mL) dos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2006

5.8.4 Níveis de TNF- α

Conforme descrito no item 4.3.9.4, foram determinados os níveis de TNF- α em amostras de plasma e sobrenadantes do líquido pleural e lavado broncoalveolar.

Não foi observada influência estatisticamente significativa do grupo ou do momento experimental nos níveis de TNF- α plasmáticos (Gráfico 18).

Gráfico 18 – Representação gráfica dos valores médios e EPM dos níveis de TNF- α plasmáticos (pg/mL) dos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2006

Em relação aos níveis de TNF- α no sobrenadante do lavado broncoalveolar, foi observada influência estatisticamente significativa do momento experimental ($F_{3,35} = 3,497$ e $p = 0.026$). O Teste de Holm-Sidak revelou diferença entre os momentos experimentais 6 e 8 quando os dois grupos foram analisados globalmente ($p = 0,003$) e entre M8 e M1 ($p = 0,049$) e M6 ($p = 0,005$) no grupo 2 (Gráfico 19).

Gráfico 19 – Representação gráfica dos valores médios e EPM dos níveis de TNF- α no lavado broncoalveolar (pg/mL) dos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2006

No sobrenadante do líquido pleural foi observada uma influência estatisticamente significativa do momento de coleta sobre os níveis de TNF- α ($F_{3,35} = 55,281$ e $p < 0,001$). O teste de Holm-Sidak revelou diferença estatisticamente significativa quando comparados todos os momentos experimentais ($p < 0.001$), exceto M1 e M8 entre si (Gráfico 20).

Quando os grupos experimentais foram analisados isoladamente, foram observadas diferenças estatísticas significativas no grupo 1 quando comparados M6 com M1 e M8 ($p < 0,001$), M7 com M8 ($p < 0.001$), e M7 com M1 ($p = 0.001$) e M6 ($p = 0.004$); de forma semelhante, foram observadas diferenças no grupo 2 quando comparados os valores de M6 com M1 e M8 ($p < 0,001$), M7 com M1 e M8 ($p < 0,001$) e M6 e M7 ($p = 0,005$). Não foram observadas diferenças entre os níveis de TNF- α nos momentos experimentais M1 e M8 em quaisquer grupos (Gráfico 20).

Gráfico 20 – Representação gráfica dos valores médios e EPM dos níveis de TNF- α no Líquido pleural (pg/mL) dos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2006

5.8.5 Contagem de células

5.8.5.1 Leucócitos circulantes

Em relação ao número total de leucócitos circulantes, não foi observada uma influência estatisticamente significativa dos fatores estudados ou da interação entre eles (Gráfico 21).

Gráfico 21 – Representação gráfica dos valores médios e EPM da contagem de leucócitos circulantes (leucócitos/mm³) dos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2005

Em relação à contagem diferencial de leucócitos, foi observada influência significativa do momento experimental tanto no número de polimorfonucleares neutrófilos ($F_{1,19} = 10,80$ e $p = 0,004$), quanto no de linfócitos ($F_{1,19} = 8,48$ e $p = 0,009$). O teste de Holm-Sidak revelou diferença estatisticamente significativa no número total dessas células entre M1 e M8 quando analisados globalmente, sendo $p = 0,004$ para os polimorfonucleares neutrófilos e $p = 0,009$ para os linfócitos.

Aplicando-se o mesmo teste nos grupos isoladamente, foi observada diferença entre M1 e M8 somente no grupo experimental 1 ($p = 0,003$ para polimorfonucleares neutrófilos e $p = 0,036$ para linfócitos) (Gráficos 22 e 23).

Gráfico 22 – Representação gráfica dos valores médios e EPM do valor absoluto de neutrófilos circulantes (células/mm³) dos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2005

Gráfico 23 – Representação gráfica dos valores médios e EPM do valor absoluto de linfócitos circulantes (células/mm³) dos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2005

5.8.5.2 Leucócitos no lavado broncoalveolar

Observou-se um efeito estatisticamente significativo do momento experimental na contagem de leucócitos presentes no lavado broncoalveolar ($F_{3,35} = 3,45$ e $p = 0,027$). O Teste de Holm-Sidak revelou que o momento experimental 1 difere dos momentos experimentais 7 ($p = 0,036$) e 8 ($p = 0,004$). Quando analisado cada grupo isoladamente, foi observada diferença estatisticamente significativa entre os momentos experimentais 1 e 8 ($p = 0,033$) no grupo 1, e entre o momento 1 e os momentos 6 ($p = 0,035$) e 8 ($p = 0,034$) no grupo 2 (Gráfico 24).

Gráfico 24 – Representação gráfica dos valores médios e EPM de contagem de leucócitos presentes no Lavado broncoalveolar (leucócitos/mm³) dos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2005

A figura 12 exemplifica os tipos celulares encontrados no lavado broncoalveolar em cada um dos momentos experimentais.

Figura 12 – Fotomicrografia de citospin do lavado broncoalveolar. A: LBA M1, (ce): células epiteliais; B: LBA M6 (mt): mastócito; C: LBA M7 (mt): mastócito; D: LBA M8 (e) eosinófilo, (ma) macrófago alveolar (Metanol-May Grunwald-Giemsa) – São Paulo – 2005

5.8.5.3 Leucócitos no líquido pleural

Foi observada influência estatisticamente significativa dos fatores grupo ($F_{1,33} = 4,68$ e $p = 0,038$) e momento experimental ($F_{3,33} = 13,907$ e $p < 0,001$) na contagem de leucócitos presentes no líquido pleural ($F_{3,35} = 3,45$ e $p = 0,027$) (Gráfico 25).

O teste de Holm-Sidak revelou diferença estatisticamente significativa no número de leucócitos presentes no líquido pleural entre os grupos experimentais ($p = 0,038$). Em relação ao momento experimental, foi observada diferença estatisticamente significativa nos valores encontrados no momento experimental 6 entre os grupos experimentais ($p = 0,030$) (Gráfico 25).

Quando analisado cada momento experimental isoladamente, foi observada diferença estatisticamente significativa entre o momento experimental 1 e os momentos 8 ($p < 0,001$), 7 ($p < 0,001$) e 6 ($p = 0,018$), e entre o momento experimental 6 e os momentos 7 ($p = 0,033$) e 8 ($p = 0,001$) (Gráfico 25).

Analisando-se isoladamente cada grupo experimental, foi observada no grupo 1 uma diferença estatística significativa entre o momento 1 e todos os outros momentos experimentais (com $p < 0,001$ para M7 e M8 e $p = 0,003$ para M6); no

grupo 2, o momento 1 diferiu do momento 7 ($p = 0,040$) e momento 8 ($p < 0,001$), enquanto o momento 6 diferiu do momento 8 ($p = 0,002$) (Gráfico 25).

Gráfico 25 – Representação gráfica dos valores médios e EPM de contagem de leucócitos presentes no líquido pleural (leucócitos/mm³) dos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2005

A Figura 13 exemplifica os tipos celulares encontrados no líquido pleural em cada um dos momentos experimentais.

Figura 13 – Fotomicrografia de citospin do líquido pleural. A: LP M1, (cm): células mesoteliais; B: LP M6 (pmn): polimorfonuclear neutrófilo; C: LP M7 (e): eosinófilo; D: LP M8 (f) figura de fagocitose (Metanol-May Grunwald-Giemsa) – São Paulo – 2005

5.8.6 Níveis plasmáticos de fibrinogênio

Não foi observada influência estatisticamente significativa do grupo ou do momento experimental, ou ainda da interação entre os dois fatores, nos níveis plasmáticos de fibrinogênio. O gráfico 26 representa os níveis plasmáticos de fibrinogênio nos momentos M1 e M8 nos animais dos grupos 1 e 2.

Gráfico 26 – Representação gráfica dos valores médios e EPM dos níveis de fibrinogênio plasmáticos (mg/dL) dos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2005

5.8.7 Hemogasometria arterial

5.8.7.1 pH arterial

Foi observada uma influência estatisticamente significativa da duração do procedimento, isto é, do grupo experimental, nos valores do pH arterial ($F_{1,24} = 16,466$ e $p < 0,001$). As diferenças entre os grupos experimentais são observadas

quando são comparados em M1 ($p = 0,015$) e em M8 ($p = 0,021$). A figura 40 representa valores médios e EPM do pH arterial mensurados nos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação.

Gráfico 27 – Representação gráfica dos valores médios e EPM do pH arterial mensurados nos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2005

5.8.7.2 Pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial - PaCO₂ arterial

A análise dos valores de PaCO₂, mostrou que existe uma influência estatisticamente significativa do momento experimental nos valores obtidos ($F_{2,27} = 4,280$ e $p = 0,024$). O teste de Holm-Sidak revelou diferença estatisticamente significativa entre os momentos experimentais 1 e 5 ($p = 0,007$). Já quando analisados separadamente os grupos, foi observada diferença significativa entre esses momentos somente no grupo 1 ($p = 0,004$) (Gráfico 28).

Gráfico 28 – Representação gráfica dos valores médios e EPM da pressão parcial de dióxido de carbono no sangue arterial (mmHg) obtidos dos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2005

5.8.7.3 Pressão parcial de oxigênio no sangue arterial - PaO₂ arterial

Não foi observada uma influência estatisticamente significativa dos fatores estudados nos valores de PaO₂ (Gráfico 29).

Gráfico 29 – Representação gráfica dos valores médios e EPM de contagem da pressão parcial de oxigênio no sangue arterial (mmHg) obtidos dos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2005

5.8.7.4 Saturação de oxigênio no sangue arterial - SaO₂ arterial

Foi observada uma influência estatisticamente significativa da interação entre os fatores grupo e momento experimental nos valores de saturação de oxigênio no sangue arterial ($F_{2,25} = 4,072$ e $p = 0,029$). Existe uma diferença estatisticamente significativa entre os valores de SaO₂ apenas no grupo experimental 1 entre os momentos 1 e 5 ($p = 0,008$) e entre o momento 5 e o momento 8 ($p = 0,037$) (Gráfico 30).

Gráfico 30 – Representação gráfica dos valores médios e EPM de saturação de oxigênio no sangue arterial (%) obtidos dos animais dos grupos 1 e 2 nos diferentes momentos de avaliação – São Paulo – 2005

6 DISCUSSÃO

A utilização de técnicas cirúrgicas minimamente invasivas tem tido utilização crescente tanto na medicina humana quanto na veterinária, com o respaldo de que esses procedimentos causam menores alterações metabólicas nos pacientes, levando a uma menor ocorrência de complicações pós-operatórias. No entanto, essa afirmação parece não poder ser aplicada às cirurgias torácicas, uma vez que a necessidade de realização do colapso pulmonar e conseqüente ventilação pulmonar unilateral, por si só, faziam com que os resultados e observações em relação à laparoscopia não pudessem ser aplicados diretamente à toracoscopia.

A idéia para a realização deste trabalho se iniciou com a necessidade de quantificar a resposta inflamatória à injúria causada pelo procedimento de toracoscopia, uma vez que essa técnica tem tido utilização crescente na espécie eqüina. A injúria causada pelo colapso e reexpansão pulmonar já é conhecida em humanos, no entanto a dúvida de quando se pode fazer a indicação de um procedimento envolvendo colapso pulmonar em pacientes da espécie eqüina permanece. Esse conhecimento se faz cada vez mais necessário, uma vez que as técnicas cirúrgicas minimamente invasivas nessa espécie vêm sendo amplamente difundidas, não tendo somente indicação diagnóstica, mas também terapêutica, como por exemplo, a ressecção pulmonar. Desta maneira é importante que se saiba os efeitos deletérios causados por essa técnica, para que se faça uma indicação segura do procedimento.

O delineamento proposto, dividindo os animais em dois grupos, objetivava a simulação dos tempos de colapso pulmonar realizados durante a rotina hospitalar, tanto para fins diagnósticos, quanto terapêuticos. A escolha dos momentos de coleta de dados se fez de maneira a avaliar a resposta inflamatória aguda apresentada pelos animais, dentro da limitação conhecida ao se realizar procedimentos com intervalos curtos de tempo que exigissem intensa manipulação ou sedação, pois esses fatores poderiam por si só interferir com os resultados obtidos. De maneira geral, o protocolo escolhido foi adequado, a maior dificuldade encontrada para a realização das coletas foi entre os momentos experimentais 1 e 6, entre os quais, a princípio, eram decorridas cerca de 2 horas e meia. Encontramos dificuldades tanto relacionadas à intolerância dos animais à repetição da técnica quanto à

impossibilidade do processamento das amostras nesse intervalo de tempo, fato que poderia interferir nos resultados. Desta maneira, fez-se a opção por realizar a coleta do momento 1, 24 horas antes da realização do procedimento cirúrgico, viabilizando assim um melhor processamento das amostras e minimizando intercorrências com os animais. No entanto, ainda assim foram observadas alterações nos resultados, principalmente da hemogasometria arterial, que podem ser decorrentes da manipulação das amostras.

A utilização de fármacos antiinflamatórios após a toracoscopia em eqüinos já foi descrita por Mackey e Weat, (1985), Mansmann e Bernard - Strother, (1985) e Zoppa (2003) como necessária para aliviar a dor e propiciar maior conforto para os animais, no entanto, uma vez que um dos objetivos do trabalho era a avaliação da resposta inflamatória provocada pelo procedimento, sua utilização tornou-se inviável. Desta forma, os animais que apresentaram qualquer sinal de dor receberam meperidina, assim como descrito no item 4.3.4. Em relação à indicação ou não da antibioticoterapia, concordamos com Zoppa (2003), que relatou ser de escolha do cirurgião a sua utilização. Uma vez que utilizamos animais hígidos, e os procedimentos foram realizados sob técnicas seguras de antisepsia, consideramos a utilização de antibióticos desnecessária.

A utilização da cânula modelo Endo Tip[®] utilizada por Zoppa (2003) e Penna (2004), foi relatada pelo primeiro autor como técnica segura para acesso da cavidade torácica, diferentemente do acesso utilizado por Mackey e Weat (1985), Mansmann e Bernard-Strother (1985) e Peroni et al. (2001). Neste trabalho, mesmo com a utilização da cânula, observamos um grau leve de laceração pulmonar, assim como descrito por Peroni et al. (2000) sugerindo que a sua utilização deve ser cuidadosa apesar de oferecer menores riscos. Este fato, no entanto, não ocasionou a ocorrência de pneumotórax residual no período pós-operatório, como observado pelos autores citados.

A ocorrência de pneumotórax residual após a realização da técnica de toracoscopia foi citada anteriormente por Peroni et al. (2000, 2001) e Zoppa et al. (2001). Nestas descrições, tal intercorrência não acarretou manifestações clínicas. Neste trabalho, observamos sua ocorrência em três animais, todos submetidos a 60 minutos de pneumotórax, sendo que dois animais apresentaram pneumotórax residual bilateral e um deles apresentou apenas um pneumotórax residual discreto no lado esquerdo. A presença de pneumotórax residual no hemitórax direito está

relacionada à ocorrência de pneumotórax bilateral durante o procedimento cirúrgico. Esse fato foi relatado anteriormente por Penna, et al. (2004) e Zoppa (2003) diferentemente de Peroni et al. (2000) que não o observou durante seus procedimentos cirúrgicos. Observamos que quando ocorre pneumotórax bilateral, este persiste no período pós-operatório, assim como pudemos observar no exame radiográfico, ao menos que seja realizada manobra para promover uma comunicação entre os hemitórax e início da aspiração pelo hemitórax contra lateral ao acesso cirúrgico, assim como descrito por Zoppa (2003).

A utilização da cirurgia torácica endoscópica na medicina eqüina, além de apresentar a vantagem de se causar uma menor injúria, pode ser realizada em animais sedados em posição quadrupedal. Tal fato envolve menor custo e risco cirúrgico quando comparados aos da cirurgia torácica convencional, como a toracotomia, no entanto, consideramos que a equipe cirúrgica deva estar preparada para reverter o procedimento em toracotomia caso seja necessário, assim como descrito anteriormente por Zoppa (2003) .

A presença de desconforto durante esse tipo de procedimento foi relatado por Peroni et al. (2000, 2001), sendo atribuído como causas a localização do portal cirúrgico e a manipulação do instrumental no espaço intercostal. Visando reduzir o desconforto, evitou-se ao máximo a manipulação do instrumental, mantendo a óptica posicionada o suficiente para observar as estruturas torácicas e avaliar a ocorrência de pneumotórax bilateral pela transparência da pleura mediastínica, assim como descrito por Peroni et al. (2000) e Zoppa (2003). Acreditamos que tal conduta permitiu a realização do procedimento sem que ocorresse o estímulo doloroso

Em relação à técnica cirúrgica utilizada observamos coerência entre os autores, já que os resultados descritos são semelhantes. A técnica de instalação de pneumotórax em eqüinos em posição quadrupedal para a realização de toracosopia já havia sido descrita na literatura por Peroni et al. (2000, 2001), Zoppa (2003), Zoppa et al. (2001, 2002). A utilização de infusão controlada de gás CO₂ aquecido para realização de toracosopia em humanos já foi descrita por Wolfer et al. (1994), sendo que esses autores não relataram alterações hemodinâmicas decorrentes da técnica, e sim dos fármacos utilizadas para sedação. Em eqüinos, a técnica foi descrita por Machado (2003) que atribuiu as alterações hemodinâmicas encontradas, não ao pneumotórax, mas à sedação utilizada para a realização do procedimento cirúrgico. A sedação já havia sido descrita como responsável por

alterações hemodinâmicas encontradas em eqüinos submetidos à toracoscopia em posição quadrupedal por Peroni et al. (2000), porém, os autores utilizaram fármacos diferentes dos utilizados por Machado (2003).

A utilização de agentes alfa-2 agonistas para realização de toracoscopia em eqüinos é descrita na literatura (PERONI et al., 2001; PERONI et al., 2000; VACHON; FISCHER, 1998), assim como a sua associação com opióides e realização de anestesia local infiltrativa com lidocaína no local da inserção do trocarte (MACHADO, 2003; ZOPPA, 2003; ZOPPA et al., 2001). Em nosso trabalho utilizamos um protocolo anestésico semelhante aos citados anteriormente na literatura por Ford et al. (1987): a associação da xilazina na dose de 0,5mg/kg com o tartarato de butorfanol na dose de 0,04 mg/kg, seguido de anestesia local infiltrativa com lidocaína a 2%. O protocolo se mostrou adequado, permitindo o acesso cirúrgico com segurança. Conseqüentemente, as doses de cada fármaco puderam ser diminuídas e, mesmo assim, proporcionar segurança para a realização do procedimento cirúrgico.

O mesmo protocolo anestésico foi posteriormente utilizado para a realização da toracocentese e das coletas de lavado broncoalveolar. A escolha do mesmo protocolo se deu pois os animais mostravam intolerância ao desconforto causado pela técnica do lavado broncoalveolar, tornando a manipulação dificultosa e trazendo riscos ao animal e à equipe envolvida. Se, por um lado, a sedação facilita a realização da técnica por si só, por outro inviabiliza a sua realização em curtos intervalos, quando existe um interesse experimental, uma vez que as sedações repetidas podem ocasionar efeitos indesejáveis, tal como hipomotilidade intestinal. Esse problema para a realização da técnica do lavado broncoalveolar provavelmente possa ser minimizado com a utilização de solução de lidocaína com o intuito de se dessensibilizar a mucosa conforme descrito por Lapointe, Vrins e Lavoie (1994) No entanto, como nesse trabalho seriam dosadas citocinas no lavado recuperado, a diluição ainda maior deste material poderia interferir significativamente nos resultados obtidos.

A técnica para a realização do lavado broncoalveolar foi semelhante à descrita anteriormente por Peroni et al. (2000). O volume utilizado para a realização do lavado broncoalveolar nesse trabalho, de 250mL, foi a metade do utilizado por Lapointe, Vrins e Lavoie (1994). Em relação ao volume recuperado, os autores relatam recuperação de $53 \pm 15\%$ do volume instilado nos animais controle do

experimento. Ito, Hobo e Kasashima (2003) relatam recuperação de $67,8 \pm 4,3$ % do volume instilado. No presente trabalho, considerando todos os lavados realizados durante o experimento, houve uma recuperação em média de $38,65 \pm 2,02$ mL, sendo correspondente a $15,46 \pm 0,80$ % do volume total instilado. Esse menor volume obtido no nosso trabalho pode ser decorrente do volume instilado, da extensão do endoscópio e da cânula utilizada e ainda, da ausência de uma bomba de sucção que foi utilizada no trabalho de Lapointe, Vrins e Lavoie (1994). A necessidade de se obter uma amostra estéril para posterior dosagem das citocinas nos ensaios biológicos, trouxe dificuldades para a realização da técnica, sendo relacionadas tanto à grande extensão do endoscópio e da cânula confeccionada para utilização neste trabalho, quanto na manipulação e escolha da metodologia a ser aplicada. O direcionamento da cânula com essa extensão é difícil; dessa maneira, apesar da instilação do líquido ter sido realizada sem intercorrências, a sua recuperação, muitas vezes, era dificultosa mesmo com a observação direta do líquido, pois não foi possível direcionar a extremidade da cânula para a sua coleta. Essas variáveis influenciaram diretamente a qualidade do lavado broncoalveolar obtido, descrito no item 5.3, cujas características variaram de límpido a ligeiramente turvo, excetuando-se os casos onde ocorreu contaminação sanguínea. Nesse caso, não foi possível determinar a causa do sangramento.

A contagem de células em lavados, de maneira geral, pode não refletir exatamente a concentração celular, uma vez que a diluição pode interferir no resultado. No nosso trabalho, a contagem de leucócitos no lavado broncoalveolar foi necessária durante a preparação das amostras para a realização da técnica de citometria de fluxo. No entanto, existem relatos de contagem celular realizada em lavados broncoalveolares na espécie equina Peroni et al. (2000), Ito, Hobo e Kasashima (2003), Sweeney et al. (1992) e Lapointe, Vrins e Lavoie (1994) aos quais podemos comparar nossos resultados. Sweeney et al. (1992) obtiveram $0,034$ a $0,330 \times 10^3$ células/mm³, Peroni et al. (2000) $0,145 \pm 0,12 \times 10^3$ células/mm³ no hemitórax direito e $0,084 \pm 0,036 \times 10^3$ células/mm³ no hemitórax esquerdo; Lapointe, Vrins e Lavoie (1994) obtiveram, antes da centrifugação das amostras, $0,085 \pm 0,091 \times 10^3$ células/mm³, Ito, Hobo e Kasashima (2003) obtiveram $0,05 \pm 0,01 \times 10^3$ células/mm³. Em nosso trabalho observamos o valor médio de $0,115 \pm 0,065 \times 10^3$ células/mm³. Nossos resultados se assemelham aos descritos na literatura por

Lapointe, Vrins e Lavoie (1994), Sweeney et al. (1992) e Peroni et al. (2000); no entanto, os volumes de solução utilizados para realização da técnica diferem entre os trabalhos, dificultando uma comparação exata. Peroni et al. (2000) utilizaram o mesmo volume de PBS e um endoscópio flexível de mesma extensão; os autores não esclareceram se utilizaram sonda ou o canal de trabalho para a recuperação da amostra ou ainda qual havia sido o método de sucção empregado. Desta maneira, assim como citado por Sweeney et al. (1992), acreditamos que essas dificuldades referentes à não padronização da técnica para realização do lavado broncoalveolar, dificultam, e até mesmo impedem, uma discussão mais elaborada dos resultados.

Em relação aos efeitos da toracosopia sobre a contagem de células no lavado broncoalveolar, observamos nesse trabalho influência estatisticamente significativa do momento experimental nessa variável, sendo que os valores obtidos em M1 diferiram de M7 e M8, correspondendo ao pré-operatório, 6 e 24 horas após o início do pneumotórax, respectivamente. Peroni et al. (2000) não observaram diferença nesse parâmetro; no entanto, sua avaliação se fez 48 horas após o procedimento cirúrgico. Não existe descrição na literatura da influência da duração do pneumotórax nessa mesma variável. Análise de variância de duas vias não mostrou influência estatisticamente significativa desse fator na concentração de leucócitos no lavado broncoalveolar, demonstrando que toracoscopias de 60 minutos de duração não provocam alterações no lavado broncoalveolar significativamente diferentes das ocasionadas por um procedimento de 30 minutos de duração.

Uma vez que a toracocentese foi realizada logo após o lavado broncoalveolar, utilizou-se mesma sedação para coleta do líquido pleural. Existem poucos relatos de realização de toracocentese na espécie eqüina e análise do líquido pleural em animais hígidos. As características apresentadas na literatura como referência, são decorrentes do estudo de 18 animais feitos por Wagner e Bennett (1982) e a mesma é utilizada por outros autores (BENNETT, 1986; COWELL et al., 1987; DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002). A literatura descreve a toracocentese como um procedimento simples, e a obtenção do líquido pleural fácil quando utilizada a técnica descrita (BENNETT, 1986; COWELL et al., 1987; DEHEER; PARRY; GRINDEM, 2002; WAGNER; BENNETT, 1982). A técnica proposta foi aplicada para a coleta de líquido pleural na cavidade torácica esquerda com sucesso, sendo que, dos 44 procedimentos realizados com sucesso, apenas 3 não forneceram amostras

adequadas, sendo considerados improdutivos. Deheer, Parry e Grindem (2002) relatam complicações relacionadas com a técnica, tais como arritmia cardíaca. Neste trabalho, o animal número 6, do grupo 1 veio a óbito durante a coleta de material do momento 6 após ter apresentado quadro de excitação, sem possibilidade de contenção física. Este episódio pode ter provocado, por estímulo da cânula mamária, arritmia cardíaca a qual não foi possível detectar durante o procedimento. Sugere-se, a partir dessa ocorrência que a sedação é muito importante para a realização do procedimento, discordando de Deheer, Parry e Grindem (2002) que não a consideram necessária. De qualquer maneira, o protocolo deve ser escolhido de acordo com as características do paciente, bem como do seu estado geral.

Em relação ao volume do líquido pleural obtido pela toracocentese, das amostras consideradas produtivas, obtivemos uma média de $1,71 \pm 0,45$ mL para as amostras em M1. Somente consideramos esse momento experimental para análise, uma vez que nos subseqüentes, os animais já haviam sido submetidos à toracoscopia, não podendo portanto ser considerados hígidos. Wagner e Bennett (1982) relataram que entre 2 e 8 mL de líquido pleural podem ser obtidos de animais saudáveis. Nossos resultados relativos ao volume de líquido pleural mostraram que não existe influência da duração do pneumotórax ou dos momentos experimentais neste parâmetro. Observamos que a toracoscopia não provocou efusão pleural, resultado este semelhante aos descritos na literatura, que não relatam a ocorrência deste processo após a realização de toracoscopia (PERONI et al., 2001; PERONI et al., 2000; ZOPPA, 2003; ZOPPA et al., 2001).

A técnica escolhida para a instalação e manutenção do pneumotórax foi adequada, permitindo a exata mensuração da pressão intratorácica antes da indução do colapso pulmonar, e também da pressão intratorácica obtida após a reexpansão pulmonar. Não foram observadas diferenças entre os valores das pressões intratorácicas iniciais e finais (tanto expiratória, quanto inspiratória). Esses resultados não podem ser confrontados com quaisquer outros, pois não existem relatos prévios na literatura referentes a esse tipo de controle.

A mensuração da PIT aplicada para a realização dos procedimentos não é comumente descrita na literatura. Machado (2003) descreveu um controle de indução de pneumotórax por infusão de gás CO₂ a baixo fluxo, mantendo a pressão intratorácica igual a 0mmHg, e com aspiração do ar intratorácico ao final do procedimento até que a pressão intratorácica se aproximasse daquela observada

antes do procedimento; no entanto, não apresentou dados referentes aos valores de pressão intratorácica observados. Peroni et al. (2000) não realizaram qualquer controle da pressão intratorácica. Penna et al. (2004) descrevem controle da PIT de animais submetidos à toracoscopia de duração de 20 minutos, não sendo observada diferença entre as pressões intratorácicas iniciais e finais. Peroni et al. (2000) instalaram o pneumotórax com a utilização de uma cânula e, ao fim do procedimento cirúrgico, o gás foi retirado da cavidade com auxílio de aspirador cirúrgico acompanhando a expansão pulmonar, completa, segundo os autores, após 15 a 20 segundos. Zoppa et al. (2001) e (2002) utilizaram aspirador cirúrgico acoplado a equipo para restabelecimento da pressão intratorácica negativa, concomitantemente à aspiração, após a qual foi realizada sutura da musculatura, assegurando-se assim a manutenção da pressão intratorácica; nesse caso, não era feito o acompanhamento da expansão pulmonar.

Já em 2003, a utilização de cânula Endo Tip[®] permitiu que Zoppa (2003) realizasse o acesso à cavidade, assim como o restabelecimento da pressão intratorácica negativa de maneira assistida, uma vez que esta cânula é introduzida por movimentos de rotação que promovem a divulsão romba dos planos musculares, e ao fim do procedimento o gás intratorácico é aspirado e a reexpansão pulmonar é acompanhada através da óptica e no momento da retirada da cânula, os planos previamente divulsionados se sobrepõem, evitando a entrada de ar na cavidade. Essa mesma cânula foi utilizada em 2004 por Penna et al. (2004) quando do início da mensuração das pressões intratorácicas, procedimento que exige a utilização da mesma.

Acreditamos que o controle das pressões intratorácicas é uma importante ferramenta no controle do pneumotórax residual, uma vez que se pode assegurar que a pressão intratorácica final seja igual ou próxima à inicial. Consideramos que esse fato traz uma maior segurança à equipe cirúrgica no que diz respeito ao controle do pneumotórax residual, no entanto para que seja realizada, se faz necessário o uso dos equipamentos descritos anteriormente. Deve-se considerar também que a não realização da técnica de controle das pressões intratorácicas não é proibitiva em relação à toracoscopia, uma vez que foram descritos outros métodos para controle do pneumotórax residual.

Em relação aos valores de pressão de oxigênio no sangue arterial (PaO₂) obtidos durante seu experimento, Machado (2003) afirma que o pneumotórax de

duração de 20 minutos não foi suficiente para causar diminuição adicional nos valores obtidos somente com a sedação. Esse resultado é coerente com os nossos, onde os valores não mostraram diferença estatisticamente significativa entre os momentos estudados ou entre os grupos, sendo que os valores médios obtidos estão dentro da faixa de normalidade. Peroni et al. (2000) relatam menores valores de PaO_2 quando da realização de toracoscopia no hemitórax esquerdo, se comparado ao direito, fato explicado pela anatomia da cavidade torácica e presença de grandes vasos, levando a uma pior perfusão pulmonar quando da instalação do pneumotórax esquerdo.

A saturação arterial de oxigênio (SaO_2) corresponde à taxa de saturação da hemoglobina pelo oxigênio, e que esta somente é influenciada por uma diminuição dos valores de PaO_2 , quando essa atinge valores abaixo de 60mmHg, ou quando se institui altas pressões durante um procedimento cirúrgico torácico. Machado (2003) não observou diferenças estatisticamente significativas nos valores de SaO_2 atribuídos à sedação ou ao pneumotórax. Nosso trabalho mostra que há uma influência estatisticamente significativa da interação dos efeitos grupo experimental e momento experimental, mostrando que existe diferença entre os valores obtidos no grupo 1 nos momentos M1 e M5, e M5 e M8, não sendo observada, no entanto, uma diferença entre os momentos M1 e M8. Desta maneira, podemos levar em consideração que existiu uma variação nos valores absolutos, porém os mesmos se mantiveram dentro da faixa de normalidade, e essa alteração não foi persistente.

Em relação à pressão parcial de dióxido de carbono (PaCO_2), que é um parâmetro utilizado para a avaliação da ventilação alveolar, nossos resultados diferiram daqueles de Machado (2003) e Peroni et al. (2000), que não observaram diferenças estatisticamente significativas entre grupos. Encontramos uma influência do momento experimental nos valores de PaCO_2 , havendo diferença entre os valores de M1 e M5, que se manteve somente no grupo 1; no entanto, tais valores estão dentro da faixa de normalidade, e desta maneira, essa diferença pode ser considerada biologicamente não significativa. Esse resultado justifica a ausência de influência estatisticamente significativa dos fatores estudados nos valores de frequência respiratória mensurados nesse trabalho, tendo ocorrido portanto uma ventilação adequada.

A observação da influência estatisticamente significativa do grupo experimental nos valores do pH arterial diverge dos resultados obtidos por Machado

(2003), que não observou alterações nos valores deste parâmetro relacionados à sedação ou ainda ao pneumotórax, assim como Peroni et al. (2000). Neste trabalho, observamos diferença estatisticamente significativa entre os grupos experimentais tanto em M1 e M8, mas não em M5, o que nos leva a concluir que essa diferença pode ser decorrente a diferenças dos indivíduos que compunham cada grupo; soma-se a isso o fato que, apesar da diferença estatística estar presente, os valores médios do pH se mantiveram dentro da normalidade e, portanto, esse resultado não tem relevância biológica.

Podemos atribuir a variação da frequência cardíaca observada nesse estudo entre os grupos experimentais no período trans-operatório à maior necessidade de reaplicação dos fármacos sedativos no grupo dois, por terem sido submetidos a um procedimento cirúrgico de maior duração. No período pós-operatório imediato e 24 horas após o procedimento cirúrgico, não foram mais observadas diferenças, assim como relatado anteriormente por Zoppa (2003), que atribuiu esse fato à técnica causar pouco estímulo doloroso.

Não observamos influência do grupo ou do momento experimental nos valores de frequência respiratória, assim como Zoppa (2003), e diferentemente de Zoppa et al. (2001), que relataram aumento da frequência e amplitude respiratórias em quatro dos seis animais experimentais utilizados por eles, sendo essa alteração relacionada ao pneumotórax, uma vez que os valores voltaram aos níveis normais após o restabelecimento da pressão intratorácica.

Zoppa (2003) não observou diferença nos valores de temperatura retal nos animais utilizados no seu trabalho. Neste estudo, tanto a duração do pneumotórax quanto os momentos experimentais influenciaram significativamente essa variável, sendo que no grupo 2, as variações entre os momentos foram mais marcantes. Acreditamos que a sedação pode ter influenciado esse resultado, já que a variação nos valores é marcante no grupo 2, e inexistente no grupo 1; no entanto, variações individuais não podem ser descartadas, uma vez que no período pré-operatório os animais dos dois grupos já apresentavam valores de temperatura corpórea diferentes. Da mesma maneira, mesmo sendo observadas tais diferenças, é importante ressaltar que os valores médios apresentados estão dentro da faixa de normalidade, atribuindo pouca importância biológica às variações deste parâmetro.

Neste trabalho, optamos pela dosagem do fibrinogênio plasmático, uma vez que a avaliação dessa proteína de fase aguda na espécie eqüina é amplamente

utilizada na rotina clínica, e os seus valores conhecidos. Não observamos variação nos níveis de fibrinogênio plasmáticos mensurados 24 horas após o procedimento em relação aos valores pré-operatórios, os valores se encontram dentro da faixa considerada normal para a espécie por Latimer e Rakich (2002), assim como Peroni (2000) que não observaram diferença nos valores mensurados após 48 horas. Esses resultados não podem ser confrontados com os obtidos por Zoppa (2003) e Penna et al. (2004), que observaram diferenças nos valores de fibrinogênio plasmáticos de animais submetidos a toracoscopia 144 e 72 horas após o procedimento cirúrgico, uma vez que os momentos de coletas diferem em todos esses estudo. Desta maneira, não podemos afirmar que não teria sido observada diferença nos valores 72 ou 144 horas após os procedimentos cirúrgicos, caso tais momentos houvessem sido incluídos na avaliação.

A técnica para dosagem de IL-1 no nosso trabalho não foi capaz de detectar essa citocina nos materiais avaliados, excetuando-se algumas amostras de líquido pleural, onde foram detectados baixos níveis de IL-1 nos momentos experimentais 7 e 8. Uma vez que não foi possível aplicar uma avaliação estatística dos valores obtidos, pouco pode se afirmar sobre esse resultado, uma vez que este pode ser decorrente de diversos fatores, tais como: a não produção ou ainda produção em baixos níveis da citocina pela espécie, não alcançando o limiar de detecção do teste, ou ainda a ausência ou baixa afinidade do anticorpo humano utilizado no teste para a citocina eqüina. O fato de termos obtido nos ensaios uma curva padrão de qualidade, descarta erros metodológicos ou defeito do kit comercial utilizado.

Por outro lado, utilizando-se ensaio biológico como metodologia para dosagem do TNF- α e IL-6, obtivemos resultados e somente devemos levar em consideração que estes, expressos em pg/mL são na verdade estimados, uma vez que utilizamos padrões de citocinas de outras espécies para estabelecimento da curva padrão.

Kisala et al. (1993) observaram maiores níveis de IL-1 e TNF- α produzidos por cultura de macrófagos derivados de pulmões com atelectasia em seu modelo experimental com ratos, sugerindo que macrófagos alveolares têm importante função na produção dessas citocinas e que seus efeitos podem ter repercussões sistêmicas tais como a febre observada em pacientes com atelectasia pulmonar. Neste trabalho, observamos que o momento experimental exerce influência nos

níveis de TNF- α e IL-6 presentes no lavado broncoalveolar, essas citocinas são provavelmente produzidas principalmente por macrófagos alveolares. Os níveis de TNF- α apresentaram diferença entre M6 e M8 quando os grupos foram analisados globalmente, com maiores níveis em M6, já a IL-6 apresentou diferença entre M1 e M7 em ambos os grupos. Esses resultados sugerem, portanto que existe uma estimulação das células presentes no trato respiratório, sendo que é possível se detectar citocinas no lavado broncoalveolar e que a produção de TNF- α por essas células antecede a de IL-6. No entanto, mesmo frente a esses resultados, na análise do lavado broncoalveolar em eqüinos deve-se levar em consideração a grande diluição do material e heterogeneidade das amostras.

Em relação às dosagens de citocinas plasmáticas, somente observamos alterações nos níveis de IL-6, sendo que níveis mais elevados foram observados em M8, e esses valores são significativamente diferentes dos encontrados em M1, M6 e M7. No entanto, quando observamos os valores expressos em pg/mL para os níveis plasmáticos desta citocina, verificamos que mesmo os valores de M8 são baixos, próximos do limiar de detecção obtido no ensaio. Esse fato nos leva a acreditar que o aumento dos níveis plasmáticos de IL-6 é muito pequeno e que ainda, não existem relatos anteriores que nos permitam atribuir a esses valores uma importância biológica. Morris et al. (1992) ao avaliarem esta citocina, observaram um aumento da atividade plasmática da mesma, com pico após 4 horas da indução de endotoxemia em cavalos. Existem relatos na literatura de avaliação de TNF- α sérico em cavalos com alterações no trato gastro intestinal (MORRIS; MOORE; CROWE, 1991) e em potros septicêmicos (MORRIS; MOORE, 1991), relatando associação entre severidade da doença e atividade da citocina.

Tomados em conjunto e levando em consideração os relatos da literatura, os resultados de dosagem das citocinas, leva-nos a inferir que o procedimento cirúrgico aplicado não foi capaz de induzir uma resposta inflamatória sistêmica intensa, confirmando os achados de Cirino (2003), no entanto é importante se ressaltar a diferença no delineamento experimental entre os trabalhos, uma vez que Cirino (2003) não avaliou esse parâmetro nos mesmos tempos que foram utilizados nesse trabalho.

Estudos foram realizados em humanos com o objetivo de se comparar a resposta do organismo frente à realização de toracotomia ou da cirurgia torácica

minimamente invasiva, tanto relacionados com os níveis de citocinas circulantes (CRAIG et al., 2001; YIM et al., 2000), no líquido pleural (WEISSFLOG et al., 1999), quanto de proteínas de fase aguda como a CRP (CRAIG et al., 2001). Ambos os grupos de pesquisadores, conferem à cirurgia minimamente invasiva uma menor resposta à injúria, justificando a realização dessa técnica.

A análise do líquido pleural, no entanto forneceu mais dados referentes aos níveis dessas citocinas. Akarsu et al. (2005) relataram que a dosagem de citocinas no líquido pleural é uma importante ferramenta para se diferenciar exsudatos ou transudatos pleurais. Observamos claramente uma influência do momento experimental nos níveis tanto de TNF- α quanto de IL-6 no líquido pleural. Em relação ao TNF- α , fica claro que existe um aumento significativo nos níveis, atingindo um pico duas horas após o início da injúria, sendo que os valores diminuem e seus níveis 24 horas após a injúria não diferem dos encontrados em M1. Weissflog et al. (1999) não observaram um aumento nos níveis dessa citocina no líquido pleural de pacientes submetidos a videotoroscopia, nossos resultados portanto diferem dos obtidos pelos autores, no entanto, deve-se considerar a diferença na metodologia aplicada e ainda à espécie estudada.

Já em relação à IL-6, observamos um aumento gradativo dos seus níveis nos momentos experimentais estudados. Esse fato sugere uma produção mais tardia dessa citocina quando comparada ao TNF- α , sendo consistente com relatos anteriores de que o TNF- α tem papel modulador na liberação da IL-6 (MORRIS et al., 1992). No entanto, em M8 ainda se observa um aumento dos níveis, pouco se pode afirmar sobre a cinética da IL-6 no líquido pleural do equino, em resposta a injúria provocada pelo procedimento cirúrgico, uma vez que não obtivemos dados posteriores à M8. Acreditamos que a grande variação dos dados obtidos em relação ao lavado broncoalveolar se deve à técnica que não permite que se tenha homogeneidade das amostras.

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, podemos afirmar que, apesar de atualmente serem descritas na literatura técnicas de biologia molecular para dosagem de citocinas em equinos (KIRISAWA et al., 2006), o ensaio biológico é um método adequado e sensível para a dosagem de citocinas nessa espécie equina, podendo ser utilizado com segurança.

Não foram observadas alterações na contagem total de leucócitos circulantes após 24 horas do procedimento cirúrgico, os valores se encontram dentro da faixa considerada normal para a espécie por Latimer e Rakich (2002). Outros autores anteriormente avaliaram o mesmo parâmetro, não encontrando alterações significativas, no entanto, foram utilizados tempos de coleta diferentes: Peroni et al. (2000), que avaliaram a contagem total de leucócitos 48 horas após o procedimento, e Zoppa (2003), empregando 72 e 144 horas após o procedimento como momentos de análise. Zoppa et al. (2001) descrevem uma tendência de aumento deste parâmetro 24 horas após o procedimento, e diminuição após 72 horas, mesmo não tendo alterações estatisticamente significativas nos valores. Diferentemente de Peroni et al. (2000) que não observaram diferença na contagem diferencial de leucócitos, observamos nesse trabalho que o momento experimental influenciou a contagem diferencial tanto de polimorfonucleares neutrófilos quanto de linfócitos, 24 horas após o procedimento cirúrgico. As alterações apresentadas no número total de linfócitos circulantes podem não apresentar significado clínico, uma vez que os seus valores médios continuam dentro da faixa considerada normal para a espécie, conforme citado por Latimer e Rakich (2002). Já os valores de neutrófilos aumentaram significativamente e ultrapassaram o limite considerado normal para a espécie pelos mesmos autores, caracterizando um quadro de neutrofilia relativa, que é um achado comum em processos inflamatórios.

Na literatura veterinária não existem relatos referentes à contagem de leucócitos no líquido pleural após a realização de toracoscopia. Em nosso trabalho observamos que esse parâmetro sofre influência tanto do grupo (duração do pneumotórax) quanto do momento experimental. Os grupos experimentais apresentaram valores significativamente diferentes de leucócitos duas horas após o procedimento cirúrgico, fato provavelmente decorrente da ausência de diferença nos valores obtidos nesse momento no grupo dois em relação aos seus valores pré-operatórios, e à grande variação dos valores de contagem dos leucócitos apresentados nesse momento pelos animais do Grupo 1. No entanto, a influência do momento experimental é facilmente explicada pela migração leucocitária decorrente do processo inflamatório causado pelo procedimento cirúrgico na cavidade torácica. Esse resultado foi observado quando os momentos experimentais foram analisados globalmente, verificando que existe diferença na contagem total de leucócitos entre

todos os momentos de coleta, caracterizando processo inflamatório agudo na cavidade torácica, ainda em curso 24 horas após o procedimento cirúrgico.

Weissflog et al. (1999) avaliaram líquido pleural de pacientes humanos submetidos à toracotomia e cirurgia torácica videoassistida e, apesar de terem encontrado níveis significativamente menores de citocinas em pacientes submetidos a videocirurgia, sugerindo assim uma menor injúria provocada por este procedimento, os autores não observaram diferenças relativas à contagem de leucócitos, e não apresentam dados relativos a esse resultado, sugerindo que a contagem de leucócitos na cavidade pode não ser um bom marcador de injúria pós-cirúrgica. De maneira contrária, a dosagem de citocinas parece fornecer dados relevantes, assim como já descrito por Weissflog et al. (1999) que analisou o líquido pleural de pacientes submetidos à cirurgia torácica, e por Craig et al. (2001) que avaliou a resposta sistêmica. Craig et al. (2001) sugeriram que a redução do trauma cirúrgico decorrente de uma cirurgia videoassistida poderia diminuir a resposta orgânica de fase aguda e, conseqüentemente, proporcionar uma melhor manutenção na homeostase da função imune dos pacientes. Em seu trabalho, observaram menores níveis séricos de CRP e IL-6, além de um menor aumento na produção de ERO por neutrófilos e macrófagos. Nosso trabalho demonstrou uma influência estatisticamente significativa do fator grupo experimental na produção de ERO por neutrófilos circulantes; no entanto, ao analisarmos isoladamente cada grupo ou momento experimental, não foram observadas diferenças pontuais estatisticamente significativas, tornando assim, nossos resultados diferentes dos obtidos por Craig et al. (2001). Neste sentido, não observamos um aumento do *burst* oxidativo de neutrófilos circulantes no período pós-operatório, indicando que não ocorreu aumento da produção de EROs; porém a discussão dos dados fica limitada pela grande diferença da metodologia entre os trabalhos.

Existem na literatura relatos referentes à análise do *burst* oxidativo em lavado broncoalveolar de eqüinos; no entanto, estão relacionados à atividade física e seus efeitos, não permitindo, portanto, uma comparação direta com aqueles obtidos nesse trabalho.

Durante a realização das análises por citometria de fluxo, observamos uma grande variação nas propriedades SSC e FSH das células tanto do lavado broncoalveolar, quanto do líquido pleural. Usualmente, se faz a análise da produção de EROs de cada uma das populações celulares identificadas na citometria de fluxo.

As populações celulares são separadas mecanicamente e posteriormente analisadas e identificadas por microscopia óptica, confirmando assim sua identificação. No entanto, para a realização do nosso protocolo experimental, as amostras obtidas foram destinadas tanto para análise por citometria de fluxo, quanto para as dosagens de citocinas. No caso do líquido pleural, apesar do material conter um número grande de células, sendo essa uma condição necessária para a realização da separação mecânica, o volume obtido era pequeno. Por outro lado, no caso do lavado broncoalveolar, tínhamos como limitação a pequena concentração de células presentes na amostra. A única amostra biológica compatível com a realização da separação mecânica neste protocolo seria o sangue, no entanto, a técnica é dispensável pois as propriedades SSC e FSH das células sanguíneas foram previamente definidas e extensamente bem descritas, sendo estes resultados facilmente reproduzidos.

Desta maneira, escolhemos avaliar a produção de EROs por neutrófilos circulantes (bem definidos por experimentos prévios), neutrófilos presentes no líquido pleural (que apresentavam propriedades SSC e FSH semelhantes às das células circulantes) e das células no geral observadas no lavado broncoalveolar (população não definida), sendo que essas apresentaram a maior diversidade entre os animais utilizados.

Apesar de não termos observado diferenças estatisticamente significativas nos valores médios de fluorescência produzida pelos neutrófilos presentes no líquido pleural, dados estes que refletem a sua produção de ERO, pudemos observar que esses valores são maiores que aqueles apresentados tanto pelos neutrófilos circulantes, quanto pelas células presentes no lavado broncoalveolar, indicando ocorrência de auto-fluorescência produzida por neutrófilos presentes no líquido pleural e macrófagos no lavado broncoalveolar, assim como descrito por Massoco²¹, (2006) (informação verbal).

²¹ Informação fornecida por Massoco em São Paulo em 2006

7 CONCLUSÕES

Frente aos resultados obtidos podemos concluir que:

1. O colapso pulmonar induzido por infusão de gás CO₂ em eqüinos hígidos provocou uma reação inflamatória localizada na cavidade torácica, caracterizada pelos resultados dos parâmetros avaliados, onde não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos experimentais. A avaliação da resposta inflamatória sistêmica pela dosagem de citocinas e mensuração do *burst* oxidativo não mostrou resultados significativos, corroborando o caráter restrito da injúria.
2. A avaliação do lavado broncoalveolar também forneceu importantes resultados acerca da injúria causada pelo procedimento.
3. A presença de pneumotórax residual foi minimizada pela técnica de controle da pressão intratorácica, sendo que sua ocorrência teve relação direta aos quadros de pneumotórax bilateral trans-operatório.
4. A pressão intratorácica pré e pós colapso pulmonar pode ser avaliada obtendo-se valores fidedignos desde que realizada com auxílio de insuflador automático de CO₂ e cânula modelo Endo Tip[®].
5. O pneumotórax bilateral consiste em uma possível intercorrência trans-operatória, no entanto é bem tolerado quando diagnosticado e revertido precocemente.
6. Após a realização deste trabalho, utilizando a metodologia e parâmetros descritos, podemos concluir que a cirurgia torácica videoassistida em eqüinos com até 60 minutos de duração causou processo inflamatório localizado, com mínimas repercussões sistêmicas sendo considerado um procedimento seguro. Desta maneira a sua indicação nessa espécie é favorecida, dependendo da condição individual de cada paciente.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. Disease of Immunity. In: KUMAR, V., ABBAS, A. K. e FAUSTO, N. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 7. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. p. 193-268.
- AKARSU, S.; KURT, A. N.; DOGAN, Y.; YILMAZ, E.; GODEKMERDAN, A.; AYGUN, A. D. The differential diagnostic values of cytokine levels in pleural effusions. **Mediators Inflamm**, v. 2005, n. 1, p. 2-8, 2005.
- ANTONY, V. B.; GODBEY, S. W.; KUNKEL, S. L.; HOTT, J. W.; HARTMAN, D. L.; BURDICK, M. D.; STRIETER, R. M. Recruitment of inflammatory cells to the pleural space. Chemotactic cytokines, IL-8, and monocyte chemotactic peptide-1 in human pleural fluids. **J Immunol**, v. 151, n. 12, p. 7216-7223, 1993.
- ARMSTRONG, S.; LEES, P. Effects of carprofen (R and S enantiomers and racemate) on the production of IL-1, IL-6 and TNF-alpha by equine chondrocytes and synoviocytes. **J Vet Pharmacol Ther**, v. 25, n. 2, p. 145-153, 2002.
- BASS, D. A.; PARCE, J. W.; DECHATELET, L. R.; SZEJDA, P.; SEEDS, M. C.; THOMAS, M. Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. **J Immunol**, v. 130, n. 4, p. 1910-1917, 1983.
- BENNETT, D. G. Evaluation of pleural fluid in the diagnosis of thoracic disease in the horse. **J Am Vet Med Assoc**, v. 188, n. 8, p. 814-815, 1986.
- BERTONE, A. L.; PALMER, J. L.; JONES, J. Synovial fluid cytokines and eicosanoids as markers of joint disease in horses. **Vet Surg**, v. 30, n. 6, p. 528-538, 2001.
- BIFFL, W. L.; MOORE, E. E.; MOORE, F. A.; PETERSON, V. M. Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? **Ann Surg**, v. 224, n. 5, p. 647-664, 1996.
- BLANC, F. X.; ATASSI, K.; BIGNON, J.; HOUSSET, B. Diagnostic value of medical thoracoscopy in pleural disease: a 6-year retrospective study. **Chest**, v. 121, n. 5, p. 1677-1683, 2002.
- CIRINO, L. M. I. **Resposta inflamatória produzida pelo colapso pulmonar provocado por oclusão do brônquio esquerdo: estudo experimental em ratos**. 2003. 110 p. Tese (Livre Docência) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

CONNER, B. D.; LEE, Y. C.; BRANCA, P.; ROGERS, J. T.; RODRIGUEZ, R. M.; LIGHT, R. W. Variations in pleural fluid WBC count and differential counts with different sample containers and different methods. **Chest**, v. 123, n. 4, p. 1181-1187, 2003.

COWELL, R. L.; TYLER, R. D.; CLINKENBEARD, K. D.; MACALLISTER, C. G. Collection and evaluation of equine peritoneal and pleural effusions. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v. 3, n. 3, p. 543-561, 1987.

CRAIG, S. R.; LEAVER, H. A.; YAP, P. L.; PUGH, G. C.; WALKER, W. S. Acute phase responses following minimal access and conventional thoracic surgery. **Eur J Cardiothorac Surg**, v. 20, n. 3, p. 455-463, 2001.

DE SMEDT, A.; VANDERLINDEN, E.; DEMANET, C.; DE WAELE, M.; GOOSSENS, A.; NOPPEN, M. Characterisation of pleural inflammation occurring after primary spontaneous pneumothorax. **Eur Respir J**, v. 23, n. 6, p. 896-900, 2004.

DEHEER, H. L.; PARRY, B. W.; GRINDEM, C. B. Pleural Fluid. In: COWELL, R. L. e TYLER, R. D. **Diagnostic cytology and hematology of the horse**. 2. ed. St. Louis: Mosby, 2002. p. 107-126.

FLAMINIO, M. J.; RUSH, B. R.; DAVIS, E. G.; HENNESSY, K.; SHUMAN, W.; WILKERSON, M. J. Characterization of peripheral blood and pulmonary leukocyte function in healthy foals. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 73, n. 3-4, p. 267-285, 2000.

FLICK, D. A.; GIFFORD, G. E. Comparison of in vitro cell cytotoxic assays for tumor necrosis factor. **J Immunol Methods**, v. 68, n. 1-2, p. 167-175, 1984.

FORD, T. S.; VAALA, W. E.; SWEENEY, C. R.; SKAND, D.; SAIK, J. E. Pleuroscopic diagnosis of gastroesophageal squamous cell carcinoma in a horse. **J Am Vet Med Assoc**, v. 190, n. 2, p. 1556-1558, 1987.

GIGUERE, S.; VIEL, L.; LEE, E.; MACKAY, R. J.; HERNANDEZ, J.; FRANCHINI, M. Cytokine induction in pulmonary airways of horses with heaves and effect of therapy with inhaled fluticasone propionate. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 85, n. 3-4, p. 147-158, 2002.

GRUYS, E.; OBWOLO, M. J.; TOUSSAINT, M. J. M. Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. **Vet Bull**, v. 64, n. 11, p. 1009-1018, 1994.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **J Immunol Methods**, v. 117, n. 1, p. 53-58, 1989.

HILL, A. G. Initiators and Propagators of the Metabolic Response to Injury. **World J Surg**, v. 24, n. 6, p. 624-629, 2000.

HILL, A. G.; HILL, G. L. Metabolic response to severe injury. **Br J Surg**, v. 85, n. 7, p. 884-890, 1998.

HUBERT, J. D.; SEAHORN, T. L.; KLEI, T. R.; HOSGOOD, G.; HOROHOV, D. W.; MOORE, R. M. Clinical signs and hematologic, cytokine, and plasma nitric oxide alterations in response to *Strongylus vulgaris* infection in helminth-naïve ponies. **Can J Vet Res**, v. 68, n. 3, p. 193-200, 2004.

ITO, S.; HOB0, S.; ETO, D.; SATO, H. Bronchoalveolar lavage for the diagnosis and treatment of pneumonia associated with transport in Thoroughbred racehorses. **J Vet Med Sci**, v. 63, n. 12, p. 1263-1269, 2001.

ITO, S.; HOB0, S.; KASASHIMA, Y. Bronchoalveolar lavage fluid findings in the atelectatic regions of anesthetized horses. **J Vet Med Sci**, v. 65, n. 9, p. 1011-1013, 2003.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Aparelho Respiratório. In: **Histologia Básica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 427.

KALOMENIDIS, I.; RODRIGUEZ, M.; BARNETTE, R.; GUPTA, R.; HAWTHORNE, M.; PARKES, K. B.; LIGHT, R. W. Patient with bilateral pleural effusion: are the findings the same in each fluid? **Chest**, v. 124, n. 1, p. 167-176, 2003.

KEHLET, H. Surgical Stress Response: Does Endoscopic Surgery Confer an Advantage? **World J Surg**, v. 23, n. 801-807, 1999.

KENT, J. E.; GOODALL, J. Assessment of an immunoturbidimetric method for measuring equine serum haptoglobin concentrations. **Equine Vet J**, v. 23, n. 1, p. 59-66, 1991.

KIRISAWA, R.; HASHIMOTO, N.; TAZAKI, M.; YAMANAKA, H.; ISHII, R.; HAGIWARA, K.; IWAI, H. Molecular characterization and functional expression of equine interleukin-1 type I and type II receptor cDNAs. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 109, n. 3-4, p. 219-231, 2006.

KISALA, J. M.; AYALA, A.; STEPHAN, R. N.; CHAUDRY, I. H. A model of pulmonary atelectasis in rats: activation of alveolar macrophage and cytokine release. **Am J Physiol**, v. 264, n. 3 Pt 2, p. R610-614, 1993.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Acute and Chronic Inflammation. In: KUMAR, V., ABBAS, A. K. e FAUSTO, N. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 7. ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. p. 47-86.

LAI-FOOK, S. J. Pleural mechanics and fluid exchange. **Physiol Rev**, v. 84, n. 2, p. 385-410, 2004.

LAPOINTE, J. M.; VRINS, A.; LAVOIE, J. P. Effects of centrifugation and specimen preparation technique on bronchoalveolar lavage analysis in horses. **Equine Vet J**, v. 26, n. 3, p. 227-229, 1994.

LATIMER, K. S.; RAKICH, P. M. Peripheral blood smears. In: COWELL, R. L. e TYLER, R. D. **Diagnostic cytology and hematology of the horse**. 2. ed. St. Louis: Mosby, 2002. p.

MACHADO, T. S. L. **Avaliação dos efeitos do pneumotórax unilateral de baixa pressão induzido em eqüinos**. 2003. 118 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MACKAY, R. J. Inflammation in horses. **Vet Clin North Am Equine Pract**, v. 16, n. 1, p. 15-27, v, 2000.

MACKEY, V. S.; WEAT, J. D. Endoscopic examination of the equine thorax. **Equine Vet J**, v. 17, n. 2, p. 140 - 142, 1985.

MAJNO, G.; JORIS, I. Inflammation. In: MAJNO, G. e JORIS, I. **Cells, tissues, and disease**. 2. ed. New York: Orford University Press, 2004. p. 307-522.

MANSMANN, R. A.; BERNARD - STROTHER, S. Thoracoscopic-assisted diaphragmatic hernia repair using a thoracic rib resection. **Vet Surg**, v. 30, n. 2, p. 175 - 178, 1985.

MASSOCO, C.; PALERMO-NETO, J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 95, n. 1-2, p. 11-19, 2003.

MASSOCO, C. O. **Receptores benzodiazepínicos periféricos e resposta imune inata de eqüinos: efeitos do Midazolam**. 2003. 125 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

MORRIS, D. D.; MOORE, J. N. Tumor necrosis factor activity in serum from neonatal foals with presumed septicemia. **J Am Vet Med Assoc**, v. 199, n. 11, p. 1584-1589, 1991.

MORRIS, D. D.; MOORE, J. N.; CROWE, N. Serum tumor necrosis factor activity in horses with colic attributable to gastrointestinal tract disease. **Am J Vet Res**, v. 52, n. 10, p. 1565-1569, 1991.

MORRIS, D. D.; MOORE, J. N.; CROWE, N.; MOLDAWER, L. L. Effect of experimentally induced endotoxemia on serum interleukin-6 activity in horses. **Am J Vet Res**, v. 53, n. 5, p. 753-756, 1992.

MUELLER, P. O.; MORRIS, D. D.; CARMICHAEL, K. P.; HENRY, M. M.; BAKER, J. J. Antemortem diagnosis of cholangiocellular carcinoma in a horse. **J Am Vet Med Assoc**, v. 201, n. 6, p. 899-901, 1992.

NOPPEN, M. Normal volume and cellular contents of pleural fluid. **Paediatr Respir Rev**, v. 5 Suppl A, n. S201-203, 2004.

NOPPEN, M.; DE WAELE, M.; LI, R.; GUCHT, K. V.; D'HAESE, J.; GERLO, E.; VINCKEN, W. Volume and cellular content of normal pleural fluid in humans examined by pleural lavage. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 162, n. 3 Pt 1, p. 1023-1026, 2000.

PENNA, A. C. B. A.; ZOPPA, A. L. V.; MACHADO, T. S. L.; SILVA, L. C. L. C. Avaliação clínica de eqüinos submetidos a pneumotórax induzido por infusão contínua controlada de CO₂. **Braz J Vet Res Anim Sci**, v. 41, n. 299 - 300, 2004, suplemento.

PERONI, J. F.; HORNER, N. T.; ROBINSON, N. E.; STICK, J. A. Equine thoracoscopy: normal anatomy and surgical technique. **Equine Vet J**, v. 33, n. 3, p. 231-237, 2001.

PERONI, J. F.; ROBINSON, N. E.; STICK, J. A.; DERKSEN, F. J. Pleuropulmonary and cardiovascular consequences of thoracoscopy performed in healthy standing horses. **Equine Vet J**, v. 32, n. 4, p. 280-286, 2000.

RAIDAL, S. L.; BAILEY, G. D.; LOVE, D. N. Flow cytometric determination of oxidative burst activity of equine peripheral blood and bronchoalveolar lavage-derived leucocytes. **Vet J**, v. 156, n. 2, p. 117-126, 1998.

RAIDAL, S. L.; LOVE, D. N.; BAILEY, G. D.; ROSE, R. J. The effect of high intensity exercise on the functional capacity of equine pulmonary alveolar macrophages and BAL-derived lymphocytes. **Res Vet Sci**, v. 68, n. 3, p. 249-253, 2000.

RAIDAL, S. L.; ROSE, R. J.; LOVE, D. N. Effects of training on resting peripheral blood and BAL-derived leucocyte function in horses. **Equine Vet J**, v. 33, n. 3, p. 238-243, 2001.

ROSSIER, Y.; SWEENEY, C. R.; HEYER, G.; HAMIR, A. N. Pleuroscopic diagnosis of disseminated hemangiosarcoma in a horse. **J Am Vet Med Assoc**, v. 196, n. 10, p. 1639-1640, 1990.

SHENNIB, H.; MULDER, D. S.; CHIU, R. C. The effects of pulmonary atelectasis and reexpansion on lung cellular immune defenses. **Arch Surg**, v. 119, n. 3, p. 274-277, 1984.

SUZUKI, S.; NIKAWA, H.; SHIBUYA, J.; HOSAKA, T.; MAEDA, S.; SUZUKI, T.; HANDA, M. Analysis of edema fluids and histologic features of the lung in reexpansion pulmonary edema during video-assisted thoracoscopic surgery. **J Thorac Cardiovasc Surg**, v. 123, n. 2, p. 387-389, 2002.

SWEENEY, C. R.; ROSSIER, Y.; ZIEMER, E. L.; LINDBORG, S. Effects of lung site and fluid volume on results of bronchoalveolar lavage fluid analysis in horses. **Am J Vet Res**, v. 53, n. 8, p. 1376-1379, 1992.

TOMPKINS, R. G. The role of proinflammatory cytokines in inflammatory and metabolic responses. **Ann Surg**, v. 225, n. 3, p. 243-245, 1997.

TRACHIOTIS, G. D.; VRICELLA, L. A.; AARON, B. L.; HIX, W. R. As originally published in 1988: Reexpansion pulmonary edema. Updated in 1997. **Ann Thorac Surg**, v. 63, n. 4, p. 1206-1207, 1997.

VACHON, A. M.; FISCHER, A. T. Thoracoscopy in the horse: diagnostic and therapeutic indications in 28 cases. **Equine Vet J**, v. 30, n. 6, p. 467-475, 1998.

WAGNER, A. E.; BENNETT, D. G. Analysis of equine thoracic fluid. **Vet Clin Pathol**, v. 11, n. 1, p. 13-17, 1982.

WEISSFLOG, D.; KROEGEL, C.; LUTTMANN, W.; GRAHMANN, P. R.; HASSE, J. Leukocyte infiltration and secretion of cytokines in pleural drainage fluid after thoracic surgery: impaired cytokine response in malignancy and postoperative complications. **Chest**, v. 115, n. 6, p. 1604-1610, 1999.

WOLFER, R. S.; KRASNA, M. J.; HASNAIN, J. U.; MCLAUGHLIN, J. S. Hemodynamic Effects of carbon dioxide insufflation during thoracoscopy. **Ann Thorac Surg**, v. 58, n. 2, p. 404-408, 1994.

YAMADA, T.; HISANAGA, M.; NAKAJIMA, Y.; KANEHIRO, H.; WATANABE, A.; OHYAMA, T.; NISHIO, K.; SHO, M.; NAGAO, M.; HARADA, A.; MATSUSHIMA, K.; NAKANO, H. Serum interleukin-6, interleukin-8, hepatocyte growth factor, and nitric oxide changes during thoracic surgery. **World J Surg**, v. 22, n. 8, p. 783-790, 1998.

YAMASHITA, K.; FUJINAGA, T.; OKUMURA, M.; TAKIGUCHI, M.; TSUNODA, N.; MIZUNO, S. Serum C-reactive protein (CRP) in horses: the effect of aging, sex, delivery and inflammations on its concentration. **J Vet Med Sci**, v. 53, n. 6, p. 1019-1024, 1991.

YIM, A. P.; WAN, S.; LEE, T. W.; ARIFI, A. A. VATS lobectomy reduces cytokine responses compared with conventional surgery. **Ann Thorac Surg**, v. 70, n. 1, p. 243-247, 2000.

ZOPPA, A. L. V. **Cirurgia torácica vídeo-assistida aplicada à ressecção pulmonar com o auxílio de sutura mecânica em eqüinos**. 2003. 123 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

ZOPPA, A. L. V.; ALVERENGA, J.; SILVA, L. C. L. C.; FERREIRA, M. A.; MIGLIATI, E. R. Toracosopia em eqüinos: técnica e emprego como método de avaliação da cavidade pleural. **Cienc Rural**, v. 31, n. 5, p. 825 - 830, 2001.

ZOPPA, A. L. V.; SILVA, L. C. L. C.; FERREIRA, M. A.; BACCARIN, R. Y. A.; FERNANDES, W. R. Toracosopia em eqüinos: estudo retrospectivo de 1998 a 2001. **Rev Bras Cienc Vet**, v. 9, n. 1, p. 253 - 254, 2002, suplemento.

APÊNDICE A – Descrição dos animais utilizados nesse trabalho segundo raça, sexo, idade e peso.

animais	idade	sexo	raça	peso (kg)
animal 1	14 anos	M	S.R.D.	480
animal 2	12 anos	M	S.R.D.	468
animal 3	9 anos	M	cruza árabe	383
animal 4	19 anos	M	S.R.D.	504
animal 5	9 anos	M	S.R.D.	470
animal 6	11 anos	M	S.R.D.	450
animal 7	19 anos	M	S.R.D.	395
animal 8	21 anos	M	S.R.D.	400
animal 9	20 anos	F	PSI	440
animal 10	10 anos	F	S.R.D.	306
animal 11	12 anos	F	S.R.D.	400
animal 12	7 anos	F	S.R.D.	442

M: macho

F: fêmea

S.R.D.: sem raça definida

PSI: Puro Sangue Inglês

kg: quilograma

APÊNDICE B - Informações referentes às características dos lavados broncoalveolares obtidos nos diferentes momentos experimentais em cada um dos animais.

ANIMAL	M1	M6	M7	M8
1	límpido com pouca contaminação	levemente turvo	levemente turvo	límpido
2	límpido	límpido	ligeiramente turvo com surfactante	ligeiramente turvo com surfactante
3	contaminação com sangue	turvo, levemente sanguinolento	turvo, levemente sanguinolento	levemente sanguinolento
4	límpido	límpido	límpido	turvo levemente sanguinolento
5	turvo	turvo	turvo	turvo
6	levemente turvo	não realizado	não realizado	não realizado
7	límpido	sercreção amarelada	límpido	turvo amarelado
8	límpido	levemente turvo	levemente turvo	levemente turvo
9	límpido	levemente turvo	levemente turvo - sanguinolento	levemente turvo - sanguinolento
10	levemente turvo	levemente turvo	límpido	com surfactante
11	límpido	não realizado	levemente turvo	contaminado (sangue)
12	contaminação com sangue	levemente turvo	levemente turvo	turvo