

Marcos Naoyuki Samano

**Estudo dos efeitos da pneumonectomia esquerda
sobre o pulmão remanescente de ratos: avaliação
das alterações histológicas e funcionais agudas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Cirurgia Torácica e
Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Fabio Biscegli Jatene

**SÃO PAULO
2008**

Marcos Naoyuki Samano

**Estudo dos efeitos da pneumonectomia esquerda
sobre o pulmão remanescente de ratos: avaliação
das alterações histológicas e funcionais agudas**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Cirurgia Torácica e
Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Fabio Biscegli Jatene

**SÃO PAULO
2008**

"Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca
tem medo e nunca se arrepende"

Leonardo da Vinci

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Massaro e Miyoko, que dedicaram suas vidas para criar e educar seus filhos. Responsáveis pela formação do meu caráter e pelos meus valores de vida. Sem eles, nada seria possível.

À Eliana, minha amada esposa, pelo seu suporte, seu apoio e seu amor incondicional. Sem ela, tudo seria impossível.

À Carolina, nosso maior presente, por me fazer lembrar e agradecer todo o dia que existe o milagre da vida. Sem ela, nada mais teria sentido.

Aos meus irmãos, Sergio e Helio, por sempre acreditarem em mim. Desde pequenos, sempre zelosos e preocupados em oferecer um bom exemplo ao irmão mais novo.

A toda minha família, firmes alicerces para o desenvolvimento do meu trabalho.

Amo muito todos vocês!

Esta tese está de acordo com as seguintes normas:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fabio Biscegli Jatene, meu orientador, meu chefe e meu mestre. Exemplo de vida pessoal e profissional, em quem me espelho todo o dia para tentar tornar-me um ser humano melhor e um profissional competente. Nenhuma palavra consegue expressar todo o agradecimento que tenho pela oportunidade de trabalhar ao seu lado.

Ao Prof. Dr. Paulo Hilário do Nascimento Saldiva, a quem admiro desde os tempos de graduação pela sua retórica e pelo seu espírito científico. Suas observações foram fundamentais para o norteamento desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Noedir Antônio Groppo Stolf, coordenador da pós-graduação na Área de Cirurgia Torácica e Cardiovascular da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela confiança em mim depositada e pelo apoio, proporcionando-me a honrosa oportunidade de desenvolver esta tese.

Ao Dr. Rogério Pazzeti, biólogo do LIM 61, com quem tive o prazer de trabalhar ao longo desta tese e quem muito me ajudou a concretizá-la.

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Pinho Moreira, impulsor do nosso Programa de Pós-Graduação, pelas discussões e pelo auxílio na análise estatística desta tese.

Ao Prof. Dr. Paulo Manuel Pêgo Fernandes, pelo auxílio em muitos momentos na condução deste trabalho. Acima de tudo pela amizade e pelo respeito ao seu trabalho que fizeram crescer minha admiração por sua pessoa.

Ao Dr. Ricardo Beyruti, que me introduziu na prática diária da cirurgia torácica permitindo auxiliá-lo em sua clínica privada, ainda durante a residência de cirurgia geral. Muito pude aprender com seus conhecimentos, sua refinada técnica cirúrgica e seu gosto pela informática.

Ao Dr. Hélio Minamoto, incansável médico, humanista, responsável por me incentivar, ainda durante a graduação, a conhecer o *National Cancer Center* de Tóquio, fato marcante e decisivo na minha escolha profissional. Ao Dr. Olavo Ribeiro Rodrigues, amigo e quem, por intermédio do Dr. Hélio, concretizou meu estágio em Tóquio.

Ao Dr. Luis Miguel Melero Sancho, por me instigar a estudar o tema de minha tese e por me acolher, ainda estudante, nos trabalhos de iniciação científica do Serviço de Cirurgia Torácica do HC/FMUSP.

Ao Dr. Tsuguo Naruke (*in memorian*), à época de meu estágio em Tóquio, vice-diretor do *National Cancer Center*. Expoente da cirurgia torácica, pioneiro na dissecação linfonodal mediastinal e dono de projeção internacional, o acaso permitiu que eu me tornasse um de seus amigos brasileiros. Foram suas as primeiras palavras de incentivo para tornar-me um cirurgião torácico.

Aos demais médicos assistentes do Serviço de Cirurgia Torácica do HC/FMUSP, Dr. José Ribas Milanez de Campos, Dr. Ângelo Fernandes e Dr. Miguel Lia Tedde pela minha formação durante a residência.

À Dra. Rosangela Monteiro, pelo auxílio na finalização desta tese e pelo apoio recebido ao longo de todos estes anos.

Ao biólogo Marcelo Zeviani, por vezes anestesista, ora instrumentador, ora intensivista dos meus animais. Sempre disponível a me ajudar neste e em outros trabalhos desenvolvidos no LIM 61.

À Dra. Iolanda de Fátima Lopes Calvo Tibério e à Dra. Carla Máximo Prado, pelo auxílio inestimável na análise imunoistoquímica desta tese.

À Dra. Thais Mauad, por estar sempre disponível para discutir os resultados.

Ao Prof. Dr. Celso Ricardo Fernandes de Carvalho e ao Dr. Rodolfo de Paula Vieira, por viabilizarem o estudo da fração endotelial da Óxido Nítrico Sintase neste modelo experimental.

Ao Dr. Paolo José Cesare Biselli, pelo auxílio na padronização da captura das imagens microscópicas.

À Profa. Dra. Vera Capelozzi, pelo carinho com que discutiu os resultados do projeto piloto desta tese.

Ao Dr. Tannas Jatene, pela disponibilidade nas etapas iniciais desta tese.

À Sra. Roseli Oliveira Araújo, confidente nos momentos de angústia, amiga e testemunha de todos meus passos desde o início de minha residência.

Aos meus colegas do Laboratório Anatômico Cirúrgico do InCor, Aristides Tadeu Correia, Eliana Ogata e Márcia Cristina Augusto, sempre disponíveis a ajudar.

À Neusa Rodrigues Dini, Juliana Lattari Sobrinho e Eva Malheiros Guiss de Oliveira, da Coordenadoria de Pós-Graduação do InCor, que tornam simples todas as tarefas árduas.

Ao Dr. Laerte Brasiliense Fusco, que me introduziu no universo da cirurgia torácica e que me deu a honra de auxiliá-lo no início de sua tese de doutoramento.

Ao Dr. Luis Marcelo Inaco Cirino, pelo incentivo durante meus plantões no HU (Hospital Universitário da USP) durante o internato e pela oportunidade em participar de um de seus trabalhos científicos.

Aos meus colegas do grupo de Transplante Pulmonar do InCor, pelo suporte, principalmente nos momentos em que tese precisou ser transplantada para o papel. Graças à boa preservação das idéias iniciais, ainda não há sinais de rejeição aos resultados apresentados.

A todos os colegas residentes do Serviço de Cirurgia Torácica do HC/FMUSP. Aos que vieram antes, pelo que me ensinaram. Aos mais novos, pelo que me ensinam até hoje. Jamais podemos entender o conhecimento como um bem pessoal. É nossa obrigação transmiti-lo e incentivar o seu aperfeiçoamento pelas gerações futuras.

RESUMO

RESUMO

Samano MN. *Estudo dos efeitos da pneumonectomia esquerda sobre o pulmão remanescente de ratos: avaliação das alterações histológicas e funcionais agudas*. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 94p.

INTRODUÇÃO: A pneumonectomia está associada à alta mortalidade e alto índice de complicações. Entre estas, o edema pulmonar pós-pneumonectomia é uma das mais graves, podendo chegar a 100% de mortalidade. Pouco se sabe acerca dos fatores etiológicos desta doença, bem como sua associação a um processo inflamatório ou estresse oxidativo. O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos agudos da pneumonectomia esquerda sobre o pulmão remanescente de ratos quanto à avaliação funcional por gasometria e avaliação histológica por formação de edema, infiltrado inflamatório, estresse oxidativo e reatividade vascular. **MÉTODOS:** Trinta e um ratos Wistar foram submetidos ao estudo. Vinte e um foram submetidos à pneumonectomia esquerda, sendo sacrificados em 48 horas (11 animais) e 72 horas (10 animais). Como controle do tratamento, 10 ratos foram submetidos à operação *sham*, sendo 5 sacrificados em 48 horas e 5 em 72 horas. A avaliação funcional foi realizada por meio de coleta de sangue arterial, gasometria e análise da relação pO_2/FiO_2 . A análise histológica consistiu da avaliação dos seguintes parâmetros: (1) grau de edema perivascular; (2) presença de infiltrado inflamatório obtido por meio da densidade de neutrófilos; (3) expressão tecidual imunoistoquímica da Óxido Nítrico Sintase (NOS) para a avaliação do estresse oxidativo e (4) do grau de reatividade vascular, medido por meio da relação luz parede (*lumen/wall ratio*). Na avaliação do estresse oxidativo, foram analisadas as isoformas induzida e endotelial da NOS (iNOS e eNOS). Além destes parâmetros, o edema pulmonar foi avaliado por meio do ganho de massa pulmonar proporcional, denominado de Índice Pulmonar (IP) e da relação do peso úmido e do peso seco (Razão U/S). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA. **RESULTADOS:** Não houve diferença entre os grupos quanto à relação pO_2/FiO_2 . Quanto à análise histológica, houve diferença quanto ao edema perivascular, infiltrado inflamatório, imunoexpressão de iNOS e eNOS e reatividade vascular. Houve interação entre a pneumonectomia e o sacrifício mais tardio, com maior índice de edema perivascular neste grupo ($p=0,0274$). Houve menor densidade de neutrófilos nos animais submetidos à pneumonectomia tanto em 48 como 72 horas ($p=0,0168$). Não houve diferença na imunoexpressão tecidual de iNOS entre os animais submetidos à pneumonectomia e seus respectivos grupos controle, mas houve diminuição no grupos de 72 horas ($p=0,0212$). A análise

imunoistoquímica da eNOS evidenciou maior expressão nos animais submetidos à pneumonectomia ($p=0,0208$). Quanto ao grau de reatividade vascular, houve menor razão L/P nos grupos sacrificados após 72 horas ($p=0,0107$), sugerindo maior vasoconstrição nestes grupos. Embora tenha havido maior ganho de massa pulmonar nos dois grupos de animais submetidos à pneumonectomia ($p=0,0033$), a Razão U/S não mostrou diferença entre os grupos. CONCLUSÕES: A pneumonectomia esquerda em ratos não causou alterações funcionais, mas causou alterações histológicas. Quanto a estas alterações, não foram de natureza inflamatória e nem relacionadas ao estresse oxidativo. Foram caracterizadas por edema perivascular e vasoconstrição, observados após 72 horas da operação.

Descritores: 1.Pneumonectomia 2.Edema pulmonar 3. Óxido nítrico sintase
4.Estresse oxidativo 5.Inflamação 6.Modelos animais

SUMMARY

SUMMARY

Samano MN. *Study of the effects of left pneumonectomy on the remaining lung of rats. assessment of acute hystological and functional alterations* [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 94p.

INTRODUCTION: Pneumonectomy is associated with high mortality and complication rates. Of these complications, post-pneumonectomy pulmonary edema is one of the most severe with a mortality rate that can reach 100%. Little is known about the etiological factors involved in this process and its association with inflammatory process or oxidative stress. The objective of this study was to analyze the acute effects of left pneumonectomy on the remaining lung of rats based on functional assessment by blood gas analysis and on histological assessment by edema formation, inflammatory infiltrate, oxidative stress and vascular reactivity. **METHODS:** Thirty one Wistar rats were included in the study. Twenty one underwent left pneumonectomy and were sacrificed in 48 hours (11 animals) and 72 hours (10 animals). Ten rats underwent sham procedure for control and five were sacrificed in 48 hours and five in 72 hours. Functional assessment was conducted by arterial blood gas and pO_2/FiO_2 ratio analyses. Histological analysis consisted of the assessment of the following parameters: (1) degree of perivascular edema; (2) presence of inflammatory infiltrate suggested by neutrophil density; (3) immunohistochemical expression of Nitric Oxide Synthase (NOS) in tissues to assess oxidative stress and (4) the degree of vascular reactivity measured by lumen/wall ratio (L/W ratio). For the assessment of oxidative stress, induced and endothelial isoforms of NOS (iNOS and eNOS) were analyzed. In addition to these parameters, pulmonary edema was assessed by means of proportional pulmonary mass gain, called Pulmonary Ratio (PR) and of the wet/dry weight ratio (W/D Ratio). The statistical analysis was conducted using the ANOVA test. **RESULTS:** The histological analysis showed difference regarding perivascular edema, inflammatory infiltrate, immunoexpression of iNOS and eNOS and vascular reactivity. The rate of perivascular edema was higher in animals submitted to pneumonectomy and sacrificed after 72 hours ($p=0.0274$). Neutrophil density was lower in animals submitted to pneumonectomy for those sacrificed after 48 and 72 hours alike ($p=0.0168$). There was no difference in the immunoexpression of iNOS in tissues between animals submitted to pneumonectomy and control groups, but such immunoexpression was reduced in both 72-hour groups ($p=0.0212$). The immunohistochemical analysis of eNOS evidenced a higher expression in animals submitted to pneumonectomy ($p=0.0208$). As concerns the degree of vascular reactivity, there was a lower W/D ratio in the groups sacrificed after 72 hours ($p=0.0107$), suggesting greater vasoconstriction in these

groups. There was no difference between the groups as to the pO_2/FiO_2 ratio. Although the two groups submitted to pneumonectomy had greater gain of mass ($p=0.0033$), there was no difference in the W/D ratio between the groups. CONCLUSIONS: Left pneumonectomy in rats did not cause functional alterations but caused histological alterations that were neither of inflammatory nature nor related to oxidative stress. The alterations included perivascular edema and vasoconstriction observed after 72 hours of the procedure.

Descriptors: 1.Pneumonectomy 2.Pulmonary edema 3.Nitric oxide synthase 4.Oxidative stress 5.Inflammation 6.Models, animals

SUMÁRIO

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Edema Pulmonar Pós-Pneumonectomia	4
2. OBJETIVO	8
3. REVISÃO DA LITERATURA	10
3.1. Histórico	11
3.2. Fisiopatologia do EPP	13
3.2.1. Sobrecarga Hídrica	13
3.2.2. Interrupção da Drenagem Linfática	14
3.2.3. Hiperinsuflação Pulmonar (Volutrauma)	15
3.2.4. Disfunção Ventricular Direita	16
3.2.5. Dano Endotelial e Aumento da Permeabilidade Capilar	17
3.3. Estresse Oxidativo	19
3.3.1. Óxido Nítrico e Óxido Nítrico Sintase	21
3.4. Modelos Experimentais de Pneumonectomia	24
4. MÉTODOS	29
4.1. Estudo Piloto	31
4.2 Desenho Experimental	33
4.3 Operação	34
4.3.1. Preparo Anestésico	34
4.3.2. Cirurgia	36
4.3.2.1. Grupo Pneumonectomia	36
4.3.2.2. Grupo Controle (Operação <i>Sham</i>)	38
4.4. Sacrifício	39
4.4.1. Dissecção da Peça	40
4.5 Análise Funcional e Histológica	42
4.5.1. Avaliação Funcional Pulmonar	42

4.5.2. Avaliação Histológica	43
4.5.2.1. Índice de Edema Perivascular (IEP)	44
4.5.2.2. Infiltrado Inflamatório	47
4.5.2.3. Estresse Oxidativo	49
4.5.2.3.1. Expressão de iNOS	49
4.5.2.3.2. Expressão de eNOS	51
4.5.2.4. Grau de Reatividade Vascular	52
4.5.3. Índice Pulmonar (IP)	54
4.5.4. Razão Peso Úmido-Peso Seco (Razão U/S)	55
4.6. Análise Estatística	56
5. RESULTADOS	57
5.1. Avaliação Funcional Pulmonar	58
5.2. Avaliação Histológica	59
5.2.1. Índice de Edema Perivascular (IEP)	59
5.2.2. Infiltrado Inflamatório	60
5.2.3. Estresse Oxidativo	61
5.2.3.1. Expressão de iNOS	61
5.2.3.2. Expressão de eNOS	62
5.2.4. Grau de Reatividade Vascular	63
5.3. Índice Pulmonar (IP)	64
5.5. Razão Peso Úmido-Peso Seco (Razão U/S)	65
6. DISCUSSÃO	66
7. CONCLUSÕES	79
8. REFERÊNCIAS	81

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços alcançados com a quimioterapia e a radioterapia no tratamento do câncer pulmonar, a ressecção cirúrgica permanece como a única opção terapêutica curativa nos pacientes portadores de lesões localizadas. As primeiras operações para o tratamento desta doença foram realizadas por meio da pneumonectomia, isto é, da remoção de um pulmão inteiro. Atualmente, a lobectomia é a operação padronizada para o tratamento do carcinoma broncogênico, sendo a pneumonectomia reservada para tumores centrais ou volumosos, nos quais não é possível a extirpação completa da lesão apenas com uma ressecção menor. Além desta indicação, doenças pulmonares inflamatórias, tuberculose, bronquiectasias e outras condições não malignas configuram como doenças nas quais a pneumonectomia surge como opção de tratamento.

A mortalidade operatória (30 dias) associada à pneumonectomia é relativamente alta, chegando a 8,6% na última década¹. Indubitavelmente, com o melhor preparo pré-operatório, aperfeiçoamento de técnicas cirúrgicas, melhora do manejo anestésico e melhora nos cuidados de terapia intensiva, houve uma sensível redução dos índices negativos associados a esta operação. A mortalidade desta operação no Massachusetts General Hospital que era de 56,5%, na década de 1930, diminuiu para 11,1% em trinta anos². Associados à maior mortalidade desta operação estão os

seguintes fatores: pneumonectomia direita; idade mais avançada; afecções associadas, como a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e cardiopatias; e a extensão da operação. Relacionados a este último fator, a pleuropneumonectomia, operação para o tratamento do mesotelioma maligno, e a pneumonectomia associada à toracectomia nos tumores com invasão da parede torácica, têm índices de mortalidade que podem alcançar 15%³.

Apesar da redução da mortalidade ao longo dos últimos anos, a incidência de complicações permanece alta, em torno de 60%⁴. As complicações respiratórias são as mais freqüentes, correspondendo a aproximadamente 15% e, neste grupo, a mortalidade pode chegar a 30%*. Entre estas complicações, a insuficiência respiratória aguda, a pneumonia, o tromboembolismo pulmonar (TEP) e o edema pulmonar são as mais relevantes.

A primeira ocorre pela incapacidade temporária do parênquima residual em permitir oxigenação sangüínea adequada e pode ser evitada com uma avaliação funcional pré-operatória adequada. Uma espirometria simples evidenciando um VEF₁<1L ou um valor predito pós-operatório menor do que 800ml é forte indício de complicações pós-operatórias, sendo contraindicativa para a realização do procedimento⁵. A pneumonia está associada ao acúmulo de secreções, geralmente decorrente de fisioterapia e analgesia inadequada e à ventilação mecânica prolongada e sua incidência varia de

* Aubrée N, Grégoire J, Jacques LF, Piraux M, Guojin L, Lacasse Y, Deslauriers J. Respiratory Complications after Pneumonectomy. An Analysis of Incidence, Risk Factors and Outcome. (Presented at 83rd AATS Annual Meeting; 2003 May 4-7; Boston, USA. Proceedings).

4,8 a 21,8%⁶. O TEP é uma grave complicação associada aos fatores de risco inerentes a este perfil de pacientes: idade avançada, presença de neoplasia e imobilização.

O edema pulmonar como complicação pós-operatória pode ocorrer após qualquer tipo de procedimento e costuma estar relacionado a alguma doença cardíaca preexistente. Pode ainda ser decorrente de tromboembolismo pulmonar, síndrome do desconforto respiratório do adulto (SDRA) ou devido a sepse, pneumonia, aspiração e fístula bronco-pleural. Quando o edema pulmonar ocorre após uma pneumonectomia, sem que nenhum destes fatores esteja presente, denomina-se Edema Pulmonar pós-Pneumonectomia (EPP).

1.1. Edema Pulmonar Pós-Pneumonectomia

Apesar de haver muitas informações na literatura a respeito da mortalidade e complicações da pneumonectomia, o EPP ainda é pouco conhecido. Talvez, porque a fisiopatologia que leva a esta complicação ainda esteja incerta. Do mesmo modo, ainda é pequeno o número de profissionais habituados a reconhecer e tratar este tipo de complicação. Além disto, é preocupante o fato de que muitas vezes ela é pouco valorizada no manuseio do paciente após a pneumonectomia. Revisão sistemática realizada em novembro de 2007 por meio da “Scientific Eletronic Library Online” (SciELO), em torno da palavra pneumonectomia e “pneumectomy” resultaram em menos de duas dezenas de artigos⁷. Destes, somente um

artigo cita o EPP como complicação relacionada à operação⁸. Isto evidencia que no Brasil este tema ainda não tem sido valorizado. Este achado porém não nos impressiona, já que a busca, realizada em novembro de 2007, empregando o termo *Postpneumectomy Pulmonary Edema* na *National Library of Medicine* (PubMed) resultou em apenas 47 artigos⁹ e apenas 2 no LILACS (Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde)¹⁰.

O EPP foi descrito pela primeira vez por Gibbon e Gibbon¹¹, em 1942, quando estes observaram que transfusão de plasma ou sangue em animais submetidos a lobectomia causou edema pulmonar grave, insuficiência respiratória e óbito. Desde então, vários autores têm relatado esta grave complicação que, apesar da baixa incidência, está associada à alta mortalidade, com diagnóstico e tratamento difíceis.

Classicamente, o EPP ocorre 2 a 3 dias após um período pós-operatório sem intercorrências, denominado período de Lua-de-mel (*"Honeymoon Period"*). Pode ainda manifestar-se 12 horas a 6 dias após ressecção pulmonar. O quadro clínico geralmente inicia-se com dispnéia leve e progressiva, hipoxemia e dificuldade na eliminação de secreções, podendo haver febre. Há rápida deterioração com evolução para insuficiência respiratória aguda e ventilação mecânica com pressão positiva após aproximadamente 12 horas. Apesar de inicialmente não haver sinais clínicos e radiológicos de edema pulmonar, ocorre súbito aparecimento de infiltrado alveolar que progride rapidamente. Radiologicamente, não há diferença destes achados para os encontrados na SDRA¹².

O EPP ocorre em aproximadamente 3 a 5% dos pacientes submetidos à pneumonectomia¹³, podendo chegar a 12,2%¹⁴. A mortalidade é muito alta, sendo relatada como 80 a 100% dos casos, apesar de que alguns trabalhos obtiveram uma menor mortalidade, possivelmente associando casos leves de EPP^{15,16}. O edema pulmonar pode ocorrer após ressecções menores como lobectomias. Nestas situações, o termo EPP ainda é frequentemente empregado.

Turnage e Lunn¹⁷ adotaram os seguintes critérios no diagnóstico do EPP: (1) Presença de dificuldade respiratória ao exame clínico; (2) Presença de infiltrado pulmonar progressivo em exames radiográficos seriados de tórax; (3) Ausência de critérios de falência cardíaca; (4) Ausência de sinais de pneumonia; (5) Ausência de sinais de sepse e (6) Ausência de sinais de aspiração. Van de Werff et al.¹⁴, em seu estudo retrospectivo, classificam o EPP por meio da análise radiográfica em premanifesto e manifesto, este último com mais sinais radiológicos de edema pulmonar.

Embora a fisiopatologia do EPP ainda não esteja completamente estabelecida, parece haver uma multifatorialidade de causas envolvidas na formação do edema. Segundo Slinger¹⁸, as causas mais prováveis são a sobrecarga hídrica, a interrupção da drenagem linfática, o aumento da pressão de capilar pulmonar e o dano endotelial. Como causas possíveis, a hiperinsuflação pulmonar (volutrauma) e a disfunção ventricular direita, enquanto que causas questionáveis seriam a ação de citocinas e a toxicidade de radicais livres.

Várias teorias têm sido propostas para justificar o edema pulmonar decorrente da pneumonectomia, mas ainda não se sabe quais fatores são predominantes. Dentre todos estes, a sobrecarga hídrica e o dano endotelial configuram como as hipóteses mais aceitas. Neste contexto, avaliar a existência ou não de um processo inflamatório, desencadeado pela pneumonectomia e que culmina com lesão do endotélio vascular pulmonar e extravazamento de líquido para o interstício, auxiliaria na prevenção e tratamento desta grave afecção. O estresse oxidativo e a liberação de radicais livres também podem desempenhar algum papel neste processo.

Modelos experimentais que analisem as alterações decorrentes da pneumonectomia no pulmão remanescente são escassos, sendo a maioria relacionada ao crescimento compensatório. Há poucos estudos que reproduzem o EPP em modelos experimentais. Desenvolver um modelo que represente esta afecção representa um importante passo para buscar formas de prevenção e tratamento eficazes.

OBJETIVO

2. OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi analisar os efeitos agudos da pneumonectomia esquerda sobre o pulmão remanescente de ratos quanto à avaliação funcional por gasometria e avaliação histológica por formação de edema, infiltrado inflamatório, estresse oxidativo e reatividade vascular.

REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Histórico

A ressecção de um pulmão como forma de tratamento para doenças pulmonares foi realizada pela primeira vez, em 1895, por Sir William MacEwen, um cirurgião escocês da Universidade de Glasgow, em múltiplas etapas em um paciente com tuberculose e empiema. Infelizmente ele não obteve sucesso, assim como outros que o sucederam. Kummel, em 1910, realizou uma pneumonectomia com ligadura do pedículo, mas o paciente faleceu no 6º dia. A primeira ligadura individual dos elementos do hilo pulmonar foi realizada por Hinz, em 1922, mas seu paciente faleceu por insuficiência cardíaca no 3º dia. Churchill (1930), Archibald (1931) e Ivanissevich (1933) também não obtiveram êxito nesta operação. A primeira pneumonectomia esquerda com sucesso foi realizada em dois tempos por Rudolf Nissen (1930), em Berlim¹⁹, porém, o crédito pela primeira pneumonectomia bem sucedida é dado a Graham e Singer²⁰, que em 1933 publicaram a primeira pneumonectomia esquerda em bloco em um paciente portador de carcinoma broncogênico. Curiosamente, Graham, que era tabagista, faleceu de carcinoma de pulmão em 1957, antes mesmo que seu paciente²¹. Overholt, em 1935, publicou a primeira pneumonectomia direita com êxito no tratamento de um paciente com tumor carcinóide²².

A partir de então, a pneumonectomia tornou-se o tratamento padronizado para o carcinoma de pulmão, permanecendo assim por aproximadamente uma década, até o relato de Churchill et al.²³, que mostrou bons resultados nos tumores de pulmão tratados por meio de lobectomia, mudando o paradigma do tratamento naquele momento²⁴. Atualmente, a lobectomia pulmonar com esvaziamento mediastinal radical é a operação padronizada para os tumores de pulmão localizados²⁵.

A nomenclatura adotada em relação à extirpação cirúrgica de um pulmão merece alguns comentários, já que pneumectomia e pneumonectomia são termos utilizados como sinônimos até mesmo no dicionário Houaiss de Língua Portuguesa²⁶. Além disso, esta dúvida não é exclusiva da nossa língua, pois provavelmente esta incerteza tem a mesma idade que a cirurgia em si. Em seu trabalho pioneiro, Graham não adotou em nenhum momento pneumonectomia ou pneumectomia, preferindo utilizar o termo “removal of an entire lung” (remoção de um pulmão inteiro)[†], possivelmente para evitar a polemização em torno do termo correto. Neste mesmo ano (1933), o Dr. Howard Lilienthal, em sua apresentação durante o 16º Encontro Anual da AATS (“American Association for Thoracic Surgery”), foi duramente criticado pelo Dr. Graham por ter adotado a palavra pneumonectomia em seu trabalho. Este último, apesar de manter-se neutro em seu artigo, defendia o termo pneumectomia, baseado no Dicionário Oxford e em outros dicionários²⁷. Atualmente, na literatura de língua inglesa, pneumonectomia predomina para definir a ressecção de um pulmão, sendo

[†] Tradução do autor

pneumectomia utilizada com menor frequência ou no intuito de descrever a ressecção de parte do pulmão, como na cirurgia redutora do volume pulmonar. Além disso, “pneumonectomy” é um descritor MeSH (*Medical Subject Heading*) catalogado sob o código E04.928.600.600, motivos pelos quais adotaremos pneumonectomia, ao invés de pneumectomia, ao longo deste trabalho.

3.2. Fisiopatologia do EPP

3.2.1. Sobrecarga Hídrica

Segundo alguns trabalhos, o excesso de volume recebido pelo paciente no período peri-operatório tem relação significativa com o aparecimento do EPP, motivo da expressão utilizada por Mathru e Blakeman²⁸: “don’t drown the down lung” (não afoguem o pulmão de baixo)[‡]. Zeldin et al.²⁹ foram os primeiros autores a associar o EPP ao excesso de volume peri-operatório. Analisando dados de alguns pacientes submetidos a pneumonectomia e que evoluíram com EPP, encontraram diferença significativa no volume de líquido recebido nas primeiras 24 horas, quando comparado ao grupo que não desenvolveu edema. Mais recentemente, Parquin et al.¹⁶ também relacionaram a hiperidratação (acima de 2000ml) no período intra-operatório ao EPP. Trabalhos mais recentes tendem a

[‡] Tradução do autor

questionar esta afirmação, por não obterem diferenças significativas no volume de líquido recebido.

3.2.2. Interrupção da Drenagem Linfática

Apesar de mecanismos de balanço das pressões oncótica e hidrostática nos capilares pulmonares serem responsáveis pelo controle do acúmulo de líquidos no pulmão, os linfáticos parecem também desempenhar um papel importante neste controle. Estima-se que, em condições normais, o fluxo através dos vasos linfáticos pode aumentar de sete a dez vezes. Entretanto, quando há aumento da pressão hidrostática devido à ressecção pulmonar, os linfáticos tornam-se ineficazes no controle desta drenagem, acarretando acúmulo de líquido no interstício³⁰.

Nohl-Oser *apud* Slinger¹⁸ mostraram que a drenagem linfática do pulmão direito é em sua maior parte (90%) ipsilateral, enquanto que a drenagem do pulmão esquerdo é dependente dos linfáticos contralaterais, pois mais de metade (55%) destes passam para o lado direito ao nível do hilo pulmonar. Assim, a pneumonectomia esquerda não interfere na drenagem do pulmão direito, ao passo que a pneumonectomia direita compromete a drenagem do pulmão esquerdo. De fato, Verheijen-Breemhaar et al.³¹ notaram maior incidência de EPP nas ressecções à direita. A pneumonectomia direita é fator de risco para aumento de morbimortalidade e os primeiros trabalhos evidenciavam maior incidência do EPP neste tipo de ressecção.

3.2.3. Hiperinsuflação Pulmonar (Volutrauma)

Denomina-se volutrauma como a lesão causada pelo volume. Apesar de ser um termo questionável, em fisiologia respiratória, entende-se que este trauma seja decorrente do excesso de volume inspiratório na ventilação mecânica, causando lesão por estresse alveolar³². Após uma pneumonectomia, é considerado como a lesão que ocorre pela hiperinsuflação do pulmão remanescente. Deslauriers et al.¹⁵ dão grande importância ao desvio mediastinal e ao volutrauma como causa do EPP. Em sua série, praticamente todos os pacientes (11/13) que evoluíram com edema tinham sistemas de drenagem convencionais, que permitem o desvio das estruturas mediastinais para o lado ipsilateral e hiperinsuflação do pulmão remanescente. Por outro lado, apenas dois pacientes que utilizaram sistema de drenagem balanceada ou que não utilizaram dreno apresentaram EPP. Justificam ainda que, após pneumonectomias esquerdas, o mediastino e o coração oferecem maior resistência ao desvio do que o contrário, motivo pelo qual o EPP é mais freqüente após pneumonectomias direitas. De modo semelhante, Alvarez et al.³³, também considerando a hiperinsuflação pulmonar como fator etiológico, preconizam a utilização da drenagem balanceada para prevenir o desenvolvimento do EPP.

A hiperinsuflação do pulmão remanescente pode acarretar um processo denominado de *air block syndrome*, no qual há acúmulo de ar na bainha perivascular causando compressão das estruturas vasculares e

hipertensão pulmonar, ocasionando o EPP. Ramenofsky *apud* Deslauriers¹³ observaram que animais submetidos à pneumonectomia e que desenvolveram hiperinsuflação pulmonar evoluíram com SDRA, resultando em óbito, enquanto que animais mantidos sob drenagem balanceada tiveram boa evolução. A análise histológica dos animais evidenciou membrana hialina, espessamento do septo intersticial e distensão dos alvéolos.

3.2.4. Disfunção Ventricular Direita

Reed et al.³⁴ demonstraram em seu estudo que pacientes submetidos a ressecção pulmonar evoluíram com disfunção ventricular direita. Houve aumento do volume final diastólico do ventrículo direito e diminuição da Fração de Ejeção do Ventrículo Direito (FEVD) no 2º dia de pós-operatório (PO). Apesar de não ter ocorrido neste grupo nenhuma alteração na Pressão Venosa Central (PVC), acredita-se que a disfunção ventricular direita também cause diminuição da drenagem linfática. Não houve aumento da Resistência Vascular Pulmonar (RVP) nesta série estudada.

Como o comportamento das medidas pressóricas hemodinâmicas no pós-pneumonectomizado ainda é incerto, medidas simples como a PVC não são parâmetros fidedignos no controle do paciente. Okada et al.³⁵ também observaram disfunção ventricular direita, caracterizada pela diminuição da FEVD, além de aumento do volume diastólico final do ventrículo direito (VDfVD). No entanto, esta disfunção não é suficiente para alterar a PVC, talvez porque o ventrículo direito (VD) funcione como um reservatório,

distendendo-se para adaptar-se ao aumento da pós-carga. Quanto às demais medidas pressóricas, não há alteração da Pressão de Artéria Pulmonar (PAP), embora haja incremento durante o exercício. O aumento da RVP parece ocorrer, embora não haja consenso sobre este achado. Wittnich et al.³⁶ demonstraram que a pneumonectomia pode levar a erro de interpretação da Pressão de Capilar Pulmonar. O enchimento do balão do cateter de termodiluição (Swan-Ganz), ocluindo grandes ramos da artéria pulmonar remanescente, pode diminuir o enchimento das câmaras esquerdas, resultando em falsa diminuição da Pressão de Átrio Esquerdo. Uma medida fidedigna poderia ser obtida impactando o cateter em um ramo periférico de pequeno calibre.

3.2.5. Dano Endotelial e Aumento da Permeabilidade Vascular

Mathru et al.³⁷, em estudo de cinco pacientes submetidos à ressecção pulmonar e que evoluíram com desconforto respiratório grave, analisaram a quantidade de proteína contida no aspirado traqueal destes pacientes, observando que a sua relação com o nível sérico foi maior do que 0,6. Fein et al.³⁸ evidenciaram que níveis altos de proteína no líquido do edema pulmonar sugerem aumento da permeabilidade capilar pulmonar. Nesta pequena série, todos os pacientes apresentavam pressão de capilar pulmonar normal, afastando a possibilidade de edema cardiogênico. O aumento da pressão de artéria pulmonar sugerindo aumento do fluxo ou vasoconstrição pulmonar secundária à hipóxia, podendo também ser

decorrente do excesso de líquido administrado, levou os autores a acreditar que o fator hidrostático seja também importante na gênese do edema pulmonar. Porém, em vigência de débito cardíaco normal ou aumentado e sem aumento da pressão de capilar pulmonar, sugere fortemente que o aumento da permeabilidade capilar exerça o papel mais importante no EPP.

A permeabilidade do endotélio pulmonar foi medida por Waller et al.³⁹ utilizando uma técnica descrita previamente para o estudo da SDRA causada por sepse ou uso de drogas. Com a utilização de albumina humana marcada com tecnécio⁹⁹ injetada duas horas após a cirurgia, e sua captação através de um “probe” portátil de captação cintilográfica, os autores evidenciaram que houve aumento da captação no pulmão remanescente, indicando haver um aumento da permeabilidade da membrana alvéolo-capilar. Neste mesmo estudo, foram realizadas medidas hemodinâmicas, como Pressão de Artéria Pulmonar Média (PAPM), Pressão Arterial Sistêmica, Pressão de Átrio Direito (PAD), Pressão de Capilar Pulmonar (PCP) e Débito Cardíaco (DC), além da dosagem de citocinas (fator de necrose tumoral α , interleucina 8, selectina-E e elastase neutrofílica). Como não houve correlação com outras medidas hemodinâmicas, senão o aumento da Resistência Vascular Pulmonar (RVP), acredita-se que as alterações de permeabilidade sejam causadas pelo aumento do fluxo sangüíneo na microvasculatura pulmonar. Como o débito cardíaco se mantém, a velocidade linear do sangue na microcirculação aumenta, ocasionando maior estresse à parede endotelial, aumentando a permeabilidade. Embora não tenham observado aumento nas citocinas

neste período, os autores relataram uma relação entre a atividade neutrofílica aumentada no período pré-operatório e o aumento da permeabilidade capilar, sugerindo, então, haver vários fatores envolvidos na etiologia do EPP.

O aumento da permeabilidade capilar explica a dificuldade que há no manejo do edema pulmonar neste grupo de pacientes, resistente às terapias convencionais como diuréticos e vasodilatadores. O real efeito que ocorre no endotélio pulmonar permanece ainda como uma incógnita. Parece haver pontos vulneráveis na microcirculação como as junções capilares que, submetidas ao estresse, quer seja decorrente do aumento da velocidade do fluxo sangüíneo ou do estiramento dos capilares, são lesadas, levando ao extravazamento para o interstício⁴⁰. É possível que, além de lesões endoteliais, haja degradação de proteoglicanas da matriz extracelular, rompendo a membrana basal e contribuindo para o desenvolvimento do edema⁴¹.

3.3. Estresse Oxidativo

Sabe-se que o estresse oxidativo pode estar envolvido na patogênese da SDRA. Não se sabe ao certo qual o papel desenvolvido pelos neutrófilos na sua etiologia. Porém, a ativação dos mesmos por mecanismos inflamatórios em processos pulmonares agudos pode acarretar na liberação de grandes quantidades de radicais livres desencadeando um processo de defesa que culmina com a Lesão Pulmonar Aguda (LPA). O peróxido de

hidrogênio (H_2O_2) é um radical livre que reflete o estresse oxidativo pulmonar. A fim de investigá-lo, Lases et al.⁴² avaliaram 28 pacientes submetidos à ressecção pulmonar (lobectomia ou pneumonectomia) por carcinoma broncogênico. Com a medida de H_2O_2 coletado a partir do ar exalado condensado e da medida de MDA (malondialdeído urinário), um marcador sistêmico de estresse oxidativo, evidenciaram que houve aumento destes marcadores somente nos pacientes submetidos à lobectomia e no paciente submetido à pneumonectomia e que desenvolveu EPP. Nos demais, não ocorreu elevação, sugerindo a possibilidade de que a manipulação cirúrgica da lobectomia, maior do que na pneumonectomia seja a causa do estresse oxidativo. Williams et al.⁴³, em estudo prospectivo, concluíram que pacientes submetidos à ressecção pulmonar sofreram estresse oxidativo, e que este pode contribuir para a formação do EPP. Como os níveis de mieloperoxidase plasmática aumentaram pouco nestes pacientes, o papel da ativação dos neutrófilos não pôde ser completamente esclarecido neste estudo.

A ventilação monopulmonar executada durante o período operatório, seguida de reexpansão pulmonar com reoxigenação do território colapsado isquêmico também é tida como causa de lesão de isquemia-reperfusão pela produção de radicais livres durante a reoxigenação. Esta lesão de isquemia-reperfusão está presente em situações como no edema pulmonar de reexpansão, na tromboendarterectomia pulmonar e nos transplantes pulmonares. O mecanismo pelo qual esses radicais livres são liberados permanece incerto, podendo estar associado à depleção de antioxidantes,

como a superóxido desmutase, o metabolismo do ácido araquidônico e prostaglandinas durante a isquemia e a liberação de radicais livres diretamente pela ativação de neutrófilos. O Óxido Nítrico também parece desempenhar importante papel no mecanismo do estresse oxidativo, na medida em que a inibição de sua liberação previne a formação de radicais livres do tipo hidroxila⁴⁴.

3.3.1. Óxido Nítrico e Óxido Nítrico Sintase

A busca pelo fator de relaxamento derivado do endotélio, um fenômeno que envolve acetilcolina, bradicinina, histamina, 5-hidroxitriptofano, entre outras tantas substâncias, culminou em diversos estudos que levaram à associação deste fator ao Óxido Nítrico (NO). Até então, não se sabia que células de mamíferos poderiam produzir NO de maneira endógena. Atualmente, sabe-se que sua síntese ocorre a partir do aminoácido L-arginina, através da ação das Óxido Nítrico Sintases (NOS), um processo denominado via da L-arginina: NO⁴⁵. O NO, até então considerado um mero poluente atmosférico, é produzido pelas células de mamíferos e participa de vários processos orgânicos, tanto fisiológicos como patológicos. A pesquisa em torno desta substância atualmente se dá em três grandes campos: o sistema nervoso, o sistema cardiovascular e a imunologia da inflamação. Isto porque foram nestes sistemas que foram descritas as três isoformas de NOS conhecidas até o momento: a endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e a induzida (iNOS). As duas primeiras são

constitutivas e expressas nas células endoteliais e neurônios, respectivamente⁴⁶.

A eNOS é dependente de cálcio/calmodulina e libera pequenas quantidades de NO, sendo responsável por manter o tônus vascular. Forças de estresse atuantes sobre o endotélio, ou mesmo a ativação de receptores do endotélio vascular, como a bradicinina ou a acetilcolina, levam a um influxo de cálcio. Por sua vez, o cálcio estimula a NO sintase constitutiva (eNOS), convertendo a L-arginina em NO, que se difunde para as células musculares lisas vizinhas e aumenta a síntese de GMPc a partir do GTP. O aumento da concentração de GMPc é responsável pela vasodilatação.

Ao nível do sistema nervoso central, o NO liberado a partir da ação da NO sintase isoforma neuronal (nNOS) participa da transmissão neuronal, estando relacionada ao processo de memória.

Já a isoforma induzida (iNOS) é independente de cálcio e é estimulada a partir da ativação de macrófagos e por fatores pró-inflamatórios, como endotoxinas bacterianas, interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e interferon γ (IFN- γ), gerando produção sustentada e liberação de grandes quantidades de NO. Nas células tumorais, bactérias, fungos e helmintos, o NO atua sobre o ciclo respiratório e síntese de DNA, ocasionando a morte celular. Por outro lado, por não ser seletivo, o NO pode gerar lesão tecidual das células vizinhas, como a que ocorre na lesão pulmonar aguda induzida por endotoxinas. Além disso, a vasodilatação profunda decorrente do choque séptico está associada ao NO

produzido a partir do iNOS que, por meio da inibição da respiração mitocondrial, também causa lesão tecidual.

A LPA, assim como sua variante mais grave, a SDRA, são caracterizadas pela hipoxemia, edema pulmonar e opacidades radiológicas. Nestas afecções, o edema pulmonar é resultado da migração de células inflamatórias e do aumento da permeabilidade na membrana alvéolo-capilar. Neste processo, vários mediadores estão envolvidos, como citocinas, interleucinas e TNF- α . Sabe-se também que na LPA decorrente de sepse, há um significativo aumento da produção de NO endógeno, às custas principalmente da iNOS, evidenciando o efeito deletério desta produção exacerbada. O bloqueio não seletivo da produção de NO, utilizando inibidores da NOS como L-NMMA (N^G-monometil-L-arginina), em pacientes com sepse e LPA, resultou em detrimento da função cardíaca e aumento da mortalidade. Embora o bloqueio seletivo da iNOS através da enzima 1400W (N-3 aminometilbenzil acetamidina) tenha demonstrado diminuição da LPA em modelos animais, o desfecho nestas situações não foi alterado. Assim, apesar da seletividade do NO produzido a partir da iNOS, seu efeito nos diferentes tecidos ainda permanece uma incógnita.

Lu et al.⁴⁷, com o emprego de um modelo experimental de perfusão pulmonar isolada, evidenciaram aumento da expressão de iNOS em pulmões submetidos à injúria de isquemia-reperfusão. Seguramente, é um dos principais fatores complicadores dos transplantes pulmonares, causando extravazamento endotelial com perda funcional e falência do enxerto. Neste modelo, também observaram tendência de diminuição da atividade da NOS

constitutiva e que o NO endógeno exerceu efeito protetor contra a injúria de isquemia-reperusão.

O estudo da asma é linha de pesquisa no laboratório de terapêutica experimental da FMUSP. A correlação da inflamação alérgica crônica de vias aéreas em modelos animais e o estudo da NOS foram focos de diversas publicações deste laboratório. Prado et al.^{48,49} utilizaram um modelo experimental de asma em cobaias, induzida com a inalação de ovoalbumina em solução fisiológica. Neste modelo, a análise indireta da NOS, através da administração de inibidores L-NAME (não seletivo) e 1400W (seletivo para iNOS), mostrou que animais que receberam L-NAME apresentaram broncoconstrição e aumento da deposição do colágeno, enquanto que o bloqueio seletivo da iNOS com 1400W teve efeito protetor atenuando a broncoconstrição e o processo inflamatório e de remodelamento das vias aéreas. Assim como em outros tecidos, o efeito deletério da iNOS e o efeito protetor das NOS constitutivas também ficam caracterizados nas vias aéreas.

3.4. Modelos Experimentais de Pneumnectomia

O maior desafio ao animal submetido à ressecção pulmonar total é manter adequada troca gasosa frente à perda de parênquima. Esta compensação ocorre por meio de dois mecanismos: aumento da capacidade de difusão no pulmão remanescente e o crescimento compensatório. Apesar deste crescimento compensatório ter sido documentado em diversas

espécies, como coelhos, camundongos e cães, a resposta é mais característica no rato. Neste animal, a pneumonectomia esquerda representa a ressecção de 35% do parênquima pulmonar. Após a operação ocorre crescimento em ritmo acelerado do pulmão remanescente e a massa total pulmonar reestabelece-se em aproximadamente 14 dias⁵⁰. Vários modelos animais têm sido estudados para se avaliar o crescimento compensatório pós-pneumonectomia, sobretudo nas últimas duas décadas, evidenciando grande preocupação da comunidade científica no que tange o aspecto crônico da cirurgia. Infelizmente, pouco se sabe em relação aos aspectos imediatos do status pós-pneumonectomia.

Zeldin et al.²⁹ foram pioneiros, tanto na identificação de uma condição crítica em pacientes recém-operados como na busca de um método de entendimento da doença. Ao analisarem dez pacientes submetidos à pneumonectomia e que tiveram óbito, observaram que em todos estes casos houve balanço hídrico positivo, estatisticamente significativo quando comparado a um grupo controle. Para reproduzir este efeito, submeteram 17 cães à pneumonectomia, infundindo maior quantidade de volume em 13 cães. Destes, seis desenvolveram EPP, enquanto que, no grupo controle, nenhum evoluiu com edema. Este foi o primeiro trabalho que tentou reproduzir experimentalmente o EPP em modelo animal. No ano seguinte, Lee et al.⁵¹ contrariavam o trabalho de Zeldin publicando um estudo em cães pneumonectomizados à esquerda e que não manifestaram edema pulmonar com a pressão de enchimento atrial normal.

Williams et al.⁵² procuraram reproduzir lesão pulmonar em ratos submetidos à ventilação monopulmonar e, em seguida, à pneumonectomia direita, sugerindo que o aumento da pressão de artéria pulmonar e o conseqüente aumento da pressão hidrostática não seriam suficientes para justificar a lesão induzida, e sim, a presença de radicais livres de oxigênio, potencial indutor para as lesões pulmonares.

Baseados no crescimento compensatório apresentado nos modelos animais, Sakuma et al.⁵³ analisaram a variação do clearance de líquido alveolar ao longo do tempo em animais submetidos à pneumonectomia, concluindo que a capacidade de remover líquido dos alvéolos do pulmão remanescente é mantida em níveis normais até o sétimo dia pós-operatório, estando aumentada no 14º e 28º dias. O mecanismo regulatório parece ser devido ao aumento do número de células tipo II e pelo “upregulation” dos canais apicais de sódio, responsáveis pela absorção.

O clearance de líquido alveolar também sofre influência de hormônios, como os glicocorticóides. Estes exercem efeitos variados sobre o organismo, atuando como moduladores do metabolismo celular, proliferação e diferenciação, resposta antiinflamatória e homeostasia de líquidos e eletrólitos. Existem evidências de que a absorção de líquido de pulmões em desenvolvimento seja regulada por glicocorticóides e de que possam propiciar a maturação dos pulmões de neonatos prematuros. Entretanto, a atuação destes hormônios no tratamento do edema pulmonar ainda é incerta. Noda et al.⁵⁴, em estudo laboratorial com ratos Sprague-Dawley, observaram que o tratamento com dexametasona ocasionou aumento do

clearance de líquido alveolar e este aumento foi inibido por amiloride, concluindo que a ação deste glicocorticóide ocorre com a modulação dos canais de sódio e da bomba de Na^+/K^+ ATPase.

Seidel et al.^{55,56} estudaram o efeito da pneumonectomia em animais (ratos Wistar) portadores de *diabetes mellitus* induzido, evidenciando aumento do número de infecções e baixa taxa de crescimento compensatório do pulmão remanescente. Os aspectos imediatos da operação não foram analisados nestes animais.

Em tese desenvolvida em nosso departamento, Bernardo et al.⁵⁷, em estudo para análise da remodelação vascular em modelo de isquemia pulmonar aguda e crônica, mostrou que a simples ligadura da artéria pulmonar esquerda causou edema no pulmão direito em 86% dos casos e em 100% dos pulmões esquerdos. Neste modelo, observou que não houve aumento do edema à direita no decorrer de 1, 7, 30 e 60 dias de pós-operatório e o edema à esquerda se reduziu gradativamente, concluindo que provavelmente a circulação brônquica supre a irrigação sangüínea do parênquima pulmonar cuja artéria foi ligada, evitando sua necrose.

Traçando-se um paralelo com a Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (SDRA), sabe-se que esta é precipitada por vários fatores, como mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, ativados pelo sistema imunológico e por meio de uma intrincada reação em cadeia a partir de um fator desencadeante, seja ele infeccioso ou inflamatório. No EPP, que é o modelo da SDRA relacionada à ressecção pulmonar, não se sabe se estes mediadores estão presentes, nem se há associação à

formação do edema pulmonar. Havendo mecanismos inflamatórios envolvidos em sua gênese, seguramente o estresse oxidativo é parte integrante deste processo.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

Utilizamos 31 ratos machos da raça Wistar, não-SPF (*specific pathogen free*), com peso médio de 300g, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP).

Os animais foram submetidos ao procedimento operatório no Laboratório de Pesquisa em Cirurgia Torácica (LIM 61) e em parceria com os Laboratórios de Poluição Atmosférica (LIM 05) e de Terapêutica Experimental (LIM 20) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Após a operação, foram mantidos em gaiolas individuais no biotério do mesmo laboratório.

Os animais receberam água e ração balanceada *ad libitum*, e foram tratados durante todo o experimento segundo as normas internacionais vigentes estabelecidas no “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” (Institute of Laboratory Animal Resources, National Academy of Sciences, Washington D.C., 1996) e seguindo aos princípios éticos na experimentação animal da legislação brasileira e do Colégio Brasileiro de Experimentação.

O presente estudo (Protocolo de Pesquisa SDC 2398/04/018) teve aprovação da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de

Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 10 de março de 2004.

4.1. Estudo Piloto

O presente estudo seguiu a um estudo piloto inicial, inicialmente para determinar a pneumonectomia a ser realizada. Embora na grade maioria das pesquisas realizadas sobre a pneumonectomia, tendo o rato como modelo experimental, tenha sido abordado o lado esquerdo, Williams et al.⁴³ realizaram a pneumonectomia direita em seus animais. Contudo, observamos que animais submetidos à pneumonectomia direita evoluíram rapidamente com insuficiência respiratória e óbito e a análise macroscópica dos pulmões esquerdos remanescentes evidenciava congestão pulmonar importante, levando-nos a concluir ser impossível praticar esta operação neste modelo experimental.

Uma vez estabelecida a operação, submetemos cinco animais à pneumonectomia esquerda com sacrifício em tempos distintos: 4, 24, 48, 72 horas e 7 dias. Com este escalonamento, tentamos estratificar e compreender as transformações que ocorrem no parênquima pulmonar e se as mesmas são tempo-dependentes. Após o sacrifício, os pulmões direitos foram fixados em formalina a 10% sob imersão e através de instilação gravitacional intra-traqueal da mesma solução por 24 horas. Os quatro lobos (superior, médio, inferior e retrocaval) foram seccionados e bloqueados em parafina, sendo confeccionadas lâminas para análise histológica com

coloração de hematoxilina/eosina. A avaliação da presença ou não de edema pulmonar se deu através da análise do espaço perivascular dos ramos arteriais distais. O achado de infiltrado perivascular presente nos animais submetidos à pneumonectomia, principalmente naqueles sacrificados após 24, 48 e 72 horas, sugeriu a necessidade de prosseguir a investigação, a fim de comprovar objetivamente estes achados iniciais. As maiores alterações histológicas foram identificadas nos lobos inferiores.

Assim, dividimos 30 animais em cinco grupos, de acordo com o momento de sacrifício: 4, 24, 48, 72 horas e 7 dias. Em cada grupo, submetemos 3 animais à pneumonectomia esquerda e 3 à operação *sham* (falsa pneumonectomia). Após a operação, os animais foram encaminhados ao biotério, recebendo alimentação e água *ad libitum*. Após o sacrifício, os pulmões direitos foram pesados e fixados em formalina e encaminhados para confecção de blocos parafinados. A análise histológica foi realizada através de medidas de *point-counting*[§] da área perivascular, correspondente ao edema perivascular. Analisamos também o ganho de massa pulmonar proporcional e o infiltrado inflamatório, observando maiores alterações nos animais sacrificados em 48 e 72 horas.

Baseados nestas alterações, decidimos realizar um estudo experimental com ênfase na fase aguda do período pós-operatório, fixando o sacrifício dos animais em 48 e 72 horas e adotando um grupo controle submetido à operação *sham*.

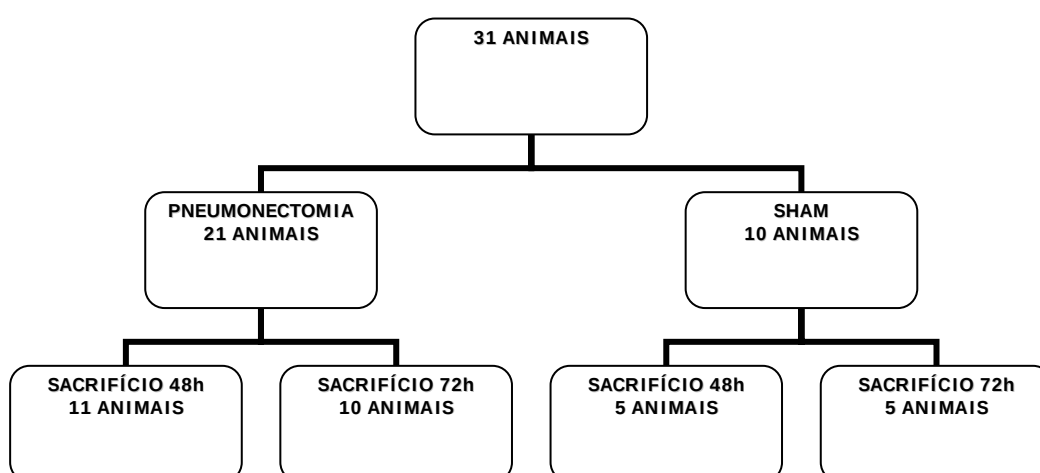
[§] Esta técnica baseia-se na utilização de um retículo de área conhecida e adaptado à ocular do microscópio óptico. Por meio da correlação entre a área deste retículo, neste caso formado por 50 retas e 100 pontos, e o corte histológico é possível obter diversas medidas semi-quantitativas, como área alveolar, diâmetro alveolar e área perivascular.

4.2. Desenho Experimental

Trinta e um animais foram distribuídos em 4 grupos, de acordo com o tratamento (pneumonectomia ou operação *sham* – controle) e o tempo de sacrifício (48 ou 72 horas após a intervenção).

Vinte e um ratos foram submetidos ao tratamento (pneumonectomia), sendo sacrificados em tempos distintos: onze sacrificados em 48 horas e 10 sacrificados em 72 horas.

Como grupo controle ao tratamento, dez animais foram submetidos à operação *sham*, sendo sacrificados em 48 horas (5 animais) e 72 horas (5 animais). O desenho experimental segue abaixo:



4.3. Operação

4.3.1. Preparo Anestésico

Os animais foram sedados em câmara contendo anestésico inalatório isoflurano (Isothane, Baxter). Após a sedação, foram colocados em um suporte de intubação, sendo mantidos suspensos pelos dentes incisivos superiores e intubados com laringoscópio pediátrico e lâmina adaptada para pequenos animais, utilizando-se cânula plástica de polietileno 14G e 7cm de comprimento (Figuras 1 e 2).

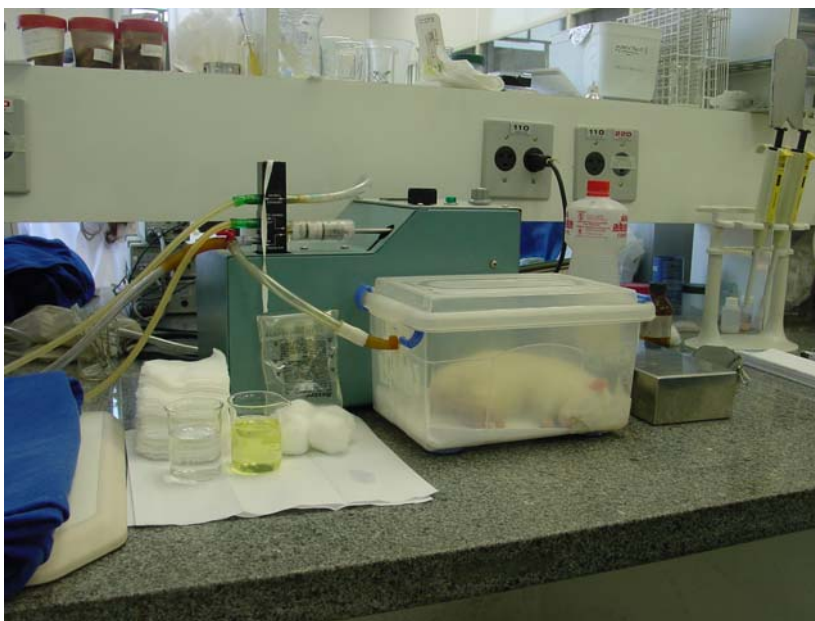


Figura 1. Câmara utilizada para sedação com isoflurano inalatório



Figura 2. Suporte para intubação com o animal sendo mantido suspenso pelos dentes incisivos. A intubação é realizada com laringoscópio pediátrico e lâmina adaptada para pequenos animais

A seguir, foram pesados em balança digital (Filizola[®]) e a cânula, conectada ao ventilador mecânico para pequenos animais (Harvard Apparatus, modelo 683), com volume corrente de 10ml/kg de massa corporal e frequência respiratória de 80 ciclos por minuto. A anestesia foi mantida com isoflurano a 2% utilizando-se um vaporizador multiagente Takaoka (K. Takaoka modelo 1415), com 100% de oxigênio e fluxo de 0,5L/min (Figura 3).



Figura 3. Bancada operatória contendo ventilador para pequenos animais (Harvard Apparatus, modelo 683), vaporizador multiagente Takaoka e estereomicroscópio Karl Zeiss

4.3.2. Cirurgia

4.3.2.1. Grupo Pneumonectomia

Os animais foram posicionados em decúbito lateral direito, sendo realizada a tricotomia do hemitórax esquerdo. A toracotomia lateral foi realizada ao nível do quinto espaço intercostal, sendo utilizado afastador de íris para afastamento das costelas. Exposta a cavidade pleural esquerda, o ligamento pulmonar inferior foi liberado com dissecção cuidadosa, a fim de evitar a abertura da cavidade pleural contralateral (Figura 4).

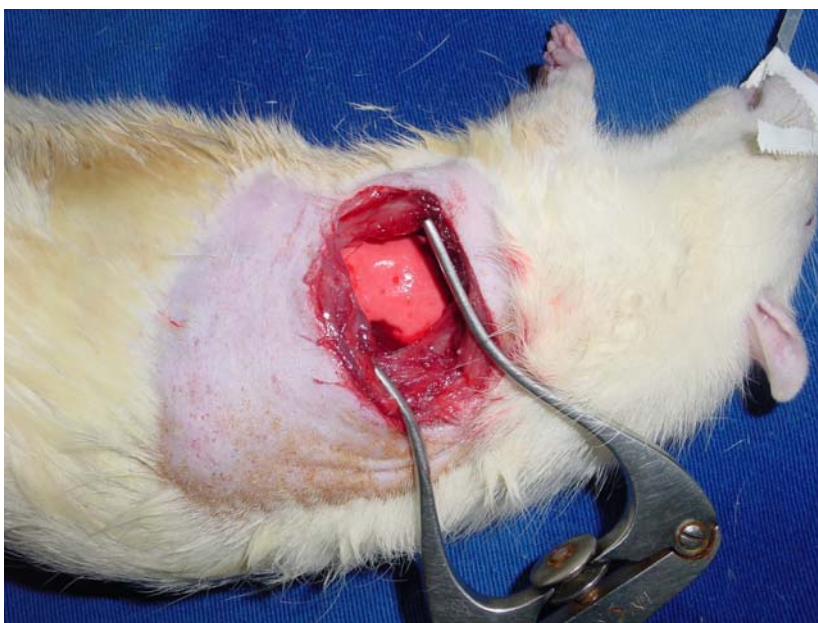


Figura 4. Toracotomia póstero-lateral ao nível do quinto espaço intercostal esquerdo, com exposição do pulmão e liberação gentil do ligamento pulmonar inferior

A ligadura das estruturas hilares foi realizada em bloco, com algodão 3-0 e secção com retirada da peça (Figura 5). Após a ligadura do pulmão esquerdo, o volume corrente foi diminuído para 8ml/kg.



Figura 5. Ligadura em bloco do hilo pulmonar esquerdo com algodão 3-0 e retirada da peça

Após a limpeza da cavidade pleural com a retirada de sangue e coágulos, um cateter 19G utilizado como dreno pleural foi posicionado através da incisão. A síntese foi realizada em três planos (intercostal, muscular e cutâneo), com fio de nylon 4-0. O dreno pleural foi mantido até o término do fechamento, imerso em selo d'água, sendo retirado ao fim da operação (Figura 6).

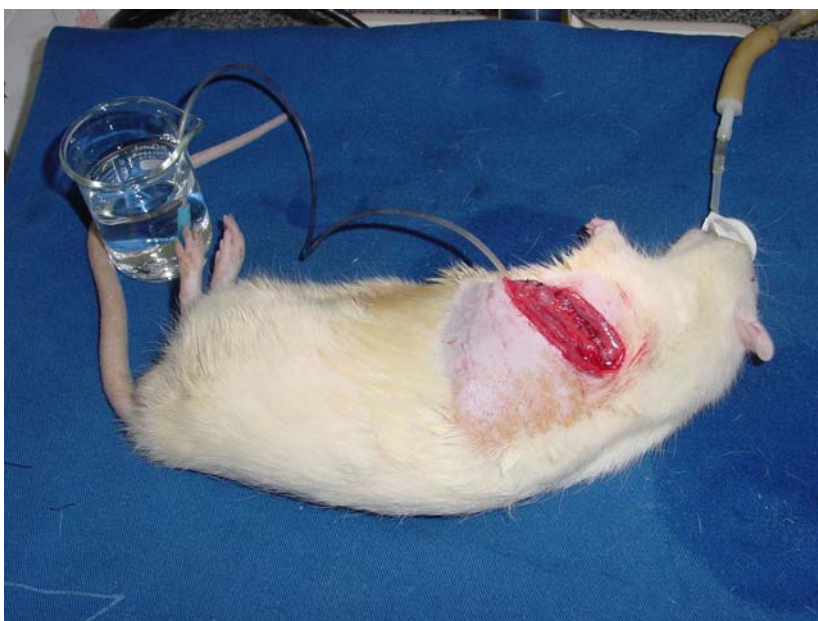


Figura 6. O fechamento da toracotomia foi realizado com nylon 4-0 em três planos (intercostal, muscular e pele). O dreno pleural foi mantido até o fechamento

Por fim, a anestesia foi interrompida com o fechamento do vaporizador multiagente e a ventilação mecânica, mantida com oxigênio a 100% até a superficialização e extubação do animal.

4.3.2.2. Grupo Controle (Operação *Sham*)

Neste grupo, de maneira semelhante, os animais foram posicionados em decúbito lateral direito, sendo a toracotomia lateral realizada ao nível do

quinto espaço intercostal. A fim de mimetizar a manipulação cirúrgica da pneumonectomia esquerda, foi realizada a liberação do ligamento pulmonar inferior por meio de dissecação romba.

A drenagem pleural foi realizada com cateter 19G utilizado como dreno pleural e posicionado através da incisão, durante o fechamento da toracotomia. A síntese foi realizada em três planos (intercostal, muscular e cutâneo), com fio de nylon 4-0, e o dreno pleural foi retirado ao fim da operação.

4.4. Sacrifício

De maneira semelhante à operação, os animais foram submetidos à indução anestésica em câmara com inalação de isoflurano. Uma vez intubados, foram novamente pesados e mantidos sob ventilação mecânica no ventilador Harvard modelo 683 com mistura de O₂ e isoflurano a 2%, volume de 8ml/kg e frequência respiratória aproximada de 80 ciclos por minuto. Através de laparotomia mediana, realizou-se a exposição da aorta abdominal e coleta de 0,5ml de sangue arterial em seringa heparinizada para análise de gases. Em seguida, a aorta foi seccionada para exangüinação e sacrifício (Figura 7).



Figura 7: Exposição da aorta abdominal para coleta de sangue para realização de gasometria arterial e sacrifício com exsanguinação por secção da mesma

4.4.1. Dissecção da Peça

Após o sacrifício, os animais foram submetidos a esternotomia mediana e o bloco coração-pulmão retirado através de dissecção das estruturas mediastinais. A traquéia foi seccionada ao nível do primeiro anel traqueal.

Utilizando-se um estereomicroscópio (Zeiss, mod. Stemi DRC) com aumento até 16x, o bloco foi dissecado sendo retirados o coração e todo tecido mediastinal excedente, restando apenas os pulmões e a traquéia. Nos animais submetidos à operação *sham*, o pulmão esquerdo foi retirado com ligadura em bloco do hilo pulmonar esquerdo (Figura 8).

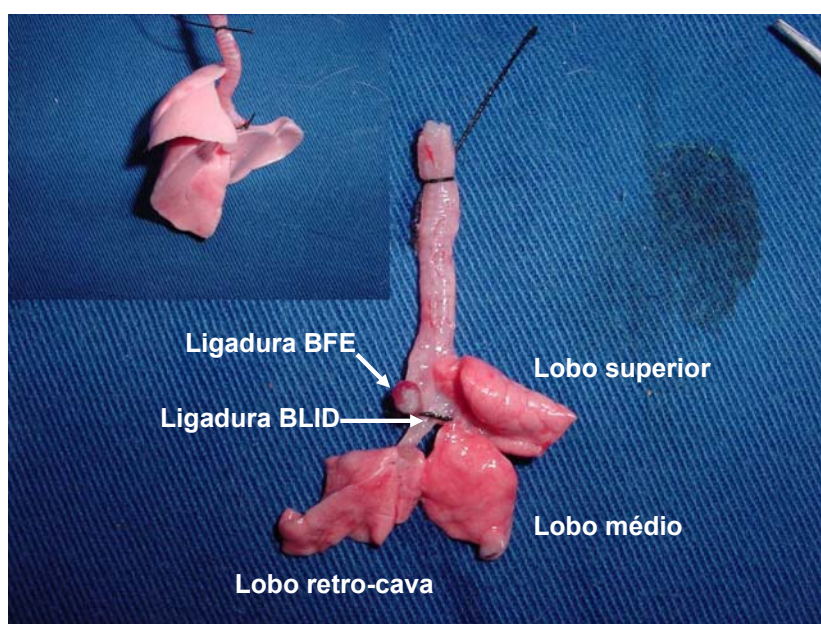


Figura 8. Peça utilizada para a determinação do peso úmido e do peso seco, consistindo da traquéia e de três lobos: superior, médio e retrocava (vista posterior). No detalhe, o pulmão direito expandido e ainda com quatro lobos. BFE: Brônquio fonte esquerdo; BLID: Brônquio do lobo inferior direito.

Esta peça contendo traquéia e pulmão direito foi pesada em balança digital de precisão (Mettler Toledo[®] modelo AG204) para obtenção do peso úmido do pulmão direito. Em seguida, o lobo inferior direito foi ressecado sob moderada insuflação e fixado em formalina tamponada a 10% para a realização da análise histológica. A peça restante, contendo a traquéia e os lobos superior, médio e retrocava, foi utilizada na determinação da relação do peso úmido e do peso seco – Razão U/S (*wet-to-dry weight ratio*). Inicialmente, esta peça foi pesada em balança digital de precisão para determinação do peso úmido. Em seguida, foi mantida em estufa (Fanem[®]) a 56°C por 72 horas e, após este período, novamente pesada em balança digital de precisão para obtenção do peso seco.

4.5. Análise Funcional e Histológica

A análise do efeito da pneumonectomia sobre o pulmão remanescente dos animais foi baseada na avaliação funcional e histológica. A avaliação funcional foi realizada através de coleta de sangue arterial e análise gasométrica para obtenção da pressão parcial de oxigênio (pO_2). A partir da relação entre este dado e a fração inspirada de oxigênio (FiO_2) obteve-se a relação pO_2/FiO_2 , uma medida direta para análise da troca gasosa.

A avaliação histológica dos pulmões remanescentes foi realizada com o intuito de analisar o grau de edema perivascular, a presença de infiltrado inflamatório, a presença de marcadores imunoistoquímicos de estresse oxidativo e o grau de reatividade vascular. A metodologia desta avaliação será pormenorizada ao longo deste capítulo.

Quanto ao edema pulmonar, utilizamos ainda outras duas medidas: o ganho de massa pulmonar em razão do peso corpóreo do animal (Índice Pulmonar – IP) e a razão entre o peso úmido e o peso seco dos pulmões remanescentes no momento do sacrifício (Razão U/S).

4.5.1. Avaliação Funcional Pulmonar

O sangue arterial coletado por punção da aorta abdominal no momento de sacrifício dos animais foi acondicionado em seringa heparinizada, resfriado e encaminhado imediatamente para análise em

Analizador de Gases Sangüíneos (Radiometer Copenhagen modelo ABL 555) do Laboratório de Investigação Médica da Disciplina de Anestesiologia da FMUSP. Foram obtidos pO_2 , pCO_2 , BE, HCO_3 e saturação da hemoglobina pelo oxigênio (sO_2). Lembrando-se que a fração inspirada de oxigênio durante o momento do sacrifício foi 1,0 (100% de oxigênio), a relação entre a pO_2/FiO_2 foi obtida como medida para avaliação funcional da troca gasosa pulmonar.

4.5.2. Avaliação Histológica

A avaliação histológica foi realizada no lobo inferior direito, uma vez que os demais lobos foram utilizados para determinação do peso seco após secagem em estufa por 56°C e 72 horas. O lobo inferior foi retirado sob moderada insuflação e imerso em formalina tamponada a 10% para fixação. Após 24 horas, o material foi recortado e encaminhado para confecção de blocos de parafina, coloração com hematoxilina/eosina e lâminas para reação imunoistoquímica.

Por meio da análise microscópica, buscou-se obter sinais de edema pulmonar perivascular, através da criação de um índice denominado Índice de Edema Perivascular (IEP). A fim de determinar o grau de inflamação decorrente da operação, foi realizada a contagem de neutrófilos e medida de sua densidade relacionada à área alveolar, obtendo-se o infiltrado inflamatório. A análise da expressão imunohistoquímica tecidual de iNOS e de eNOS foi realizada para avaliação do estresse oxidativo. Por fim, para

avaliar o grau de reatividade vascular decorrente da pneumonectomia, realizou-se a análise de artérias pulmonares de pequeno calibre para obtenção da razão luz-parede (*lumen/wall ratio*).

4.5.2.1. Índice de Edema Perivascular (IEP)

O modelo de sistema linfático pulmonar baseia-se na existência de dois compartimentos: o primeiro, no espaço intersticial que contém os vasos linfáticos terminais e o segundo, o espaço perivascular por onde os vasos linfáticos drenam o interstício⁵⁸. Assim, para que haja acúmulo de edema intersticial e alveolar ocorre inicialmente a saturação do espaço perivascular, nesta situação também denominado de “cuff” perivascular.

A medida do “cuff” perivascular foi realizada utilizando-se o programa UTHSCSA Image Tool versão 3.0, um processador de imagens desenvolvido pelo “Department of Dental Diagnostic Science of the University of Texas Health Science Center”, San Antonio, USA. Este programa foi utilizado por Monteiro et al.⁵⁹ em tese desenvolvida no mesmo laboratório, para a mensuração da espessura dos ventrículos, bem como das áreas das cavidades ventriculares em um modelo experimental de enfisema em ratos induzido por papaína, mostrando ser adequado para a análise de imagens capturadas digitalmente.

As imagens digitais dos vasos para análise do “cuff” perivascular foram obtidas a partir das lâminas dos lobos inferiores dos animais, corados com hematoxilina e eosina. Utilizou-se para tanto o analisador de imagens,

composto por microscópio Nikon (modelo Eclipse E200), câmera de captura de vídeo Samsung conectada a monitor Gradiente e placa de captura Dazzle DVC 90 (Pinnacle™ Systems Inc.). O programa utilizado para a captura da imagem digital foi Pinnacle™ Studio Plus versão 9.3 e o aumento óptico foi de 400x (Figura 9).

Para cada animal, foram obtidas vinte imagens digitais de vasos com diâmetro máximo de 75µm, para que pudessem ser inteiramente analisados no monitor do analisador de imagem.

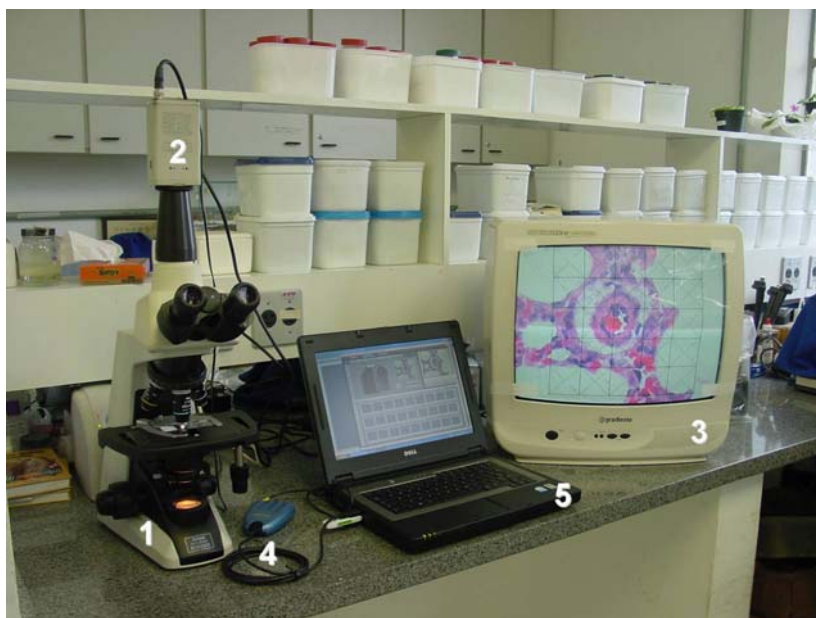


Figura 9. Sistema de captura de imagens composto de microscópio (1), câmera de captura (2), monitor (3), placa de captura (4) e microcomputador (5)

Todas as imagens obtidas foram analisadas por dois observadores independentes, cegos em relação à identificação dos animais de cada grupo. A unidade de medida foi pixels e a unidade de área, pixels². Os índices obtidos, por se tratarem de relações, foram dados em números absolutos. A medida inicial, denominada Área do Vaso (AV), foi obtida com a delimitação da membrana basal do vaso analisado (Figura 10). A segunda área,

denominada Área Perivascular Total (APT), foi obtida com a marcação do “cuff perivascular”, incluindo o vaso (Figura 11).

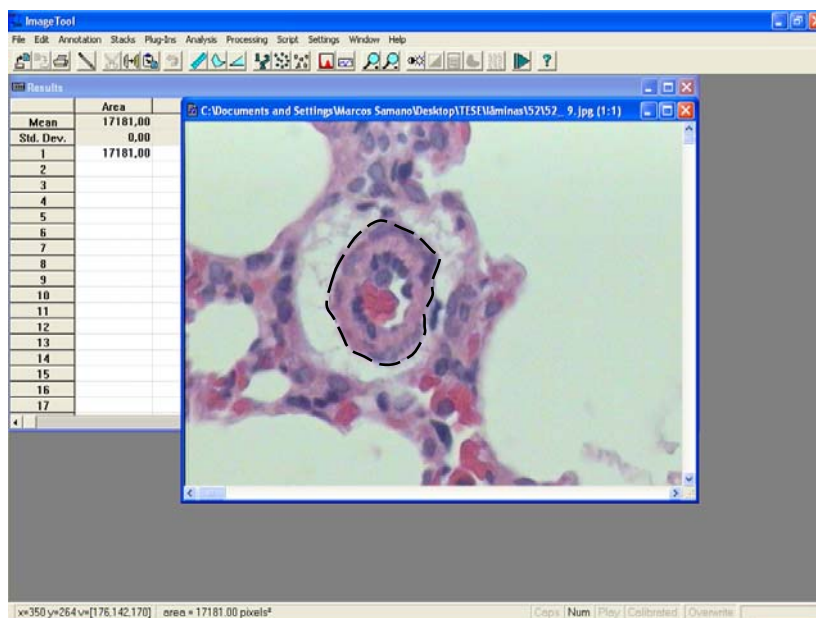


Figura 10. Área do vaso (AV) medida em pixels², através do programa UTHSCSA Image Tool. Neste exemplo, AV=17181pixels²

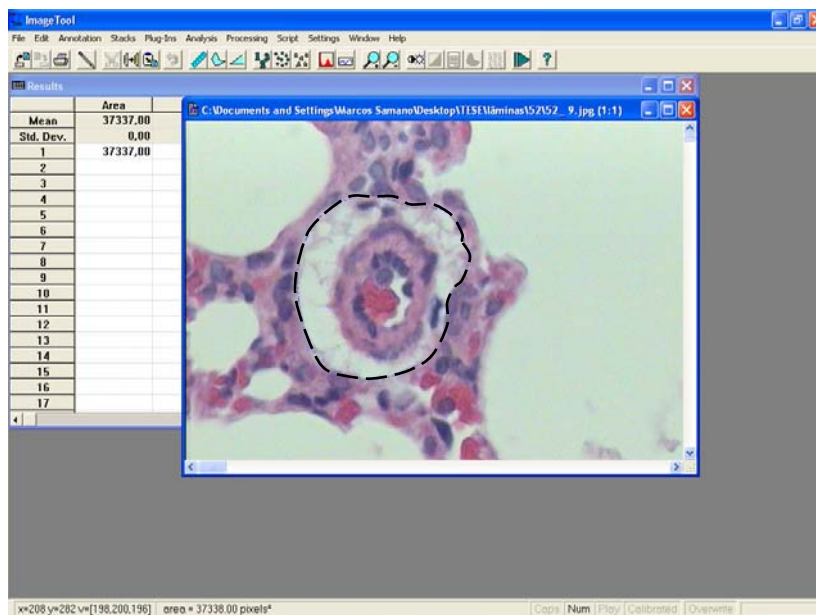


Figura 11. Área perivascular total (APT) medida com o uso do programa UTHSCSA Image Tool, correspondendo a 37337pixels².

A Área de Edema Perivascular (AEP) foi obtida por meio da APT menos a AV (Figura 12). A razão da AEP e da AV foi denominada de Índice de Edema Perivascular (IEP) e expresso em números absolutos:

$$\text{IEP} = \text{AEP}/\text{AV}$$

Onde: AEP = Área de Edema Perivascular = APT - AV

AV = Área do Vaso

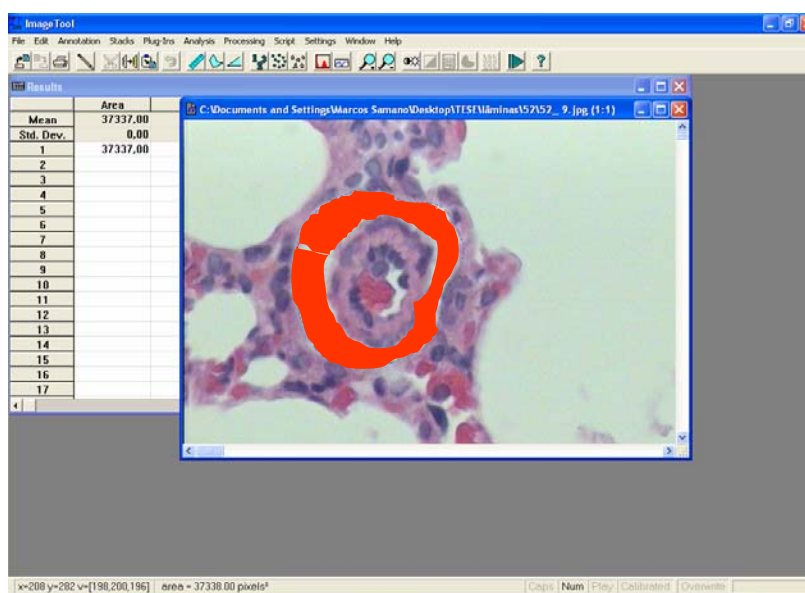


Figura 12. Área de edema perivascular (AEP), obtida a partir da subtração da área do vaso (AV) da área perivascular total (APT). Neste exemplo, a área de edema perivascular foi igual a 20156pixels² (APT-AV) e o IEP, igual a 1,173.

O IEP médio por animal foi dado pela média dos vinte vasos analisados e IEP correspondentes.

4.5.2.2. Infiltrado Inflamatório

Os neutrófilos desempenham papel fundamental no processo inflamatório agudo e sua presença infiltrando o tecido alveolar é um

indicador de atividade inflamatória. Neste modelo, esta atividade foi avaliada por meio da densidade de neutrófilos. A contagem de neutrófilos foi realizada manualmente nas lâminas coradas com hematoxilina e eosina. Foram analisados 20 campos aleatórios no aumento de 400x de parênquima pulmonar. Quando houve dúvida na identificação do tipo celular, utilizou-se aumento de 1000x com óleo de imersão para a confirmação.

Os campos pulmonares foram analisados utilizando-se o analisador de imagens detalhado na página 37. Um retículo, de tamanho conhecido, conforme descrito por Flo et al⁶⁰ foi sobreposto ao monitor de vídeo. No aumento de 400x, a área total correspondente a este retículo é de $5625\mu\text{m}^2$ (Figura 13).

O número de vezes que estruturas do parênquima pulmonar coincidem com os pontos determina a área alveolar (AA). Esta medida é importante para determinar a densidade de neutrófilos (DN) que é dada pelo número de neutrófilos por área alveolar. Para cada campo pulmonar, determinamos a DN e a média destes vinte campos resultou na DN do animal correspondente. A unidade de medida utilizada foi neutrófilos/ $10^6\mu\text{m}^2$:

$$AA = (\text{Número de pontos coincidentes} / 61) \times 5625\mu\text{m}^2$$

$$DN = \text{Número de neutrófilos por campo} / AA$$

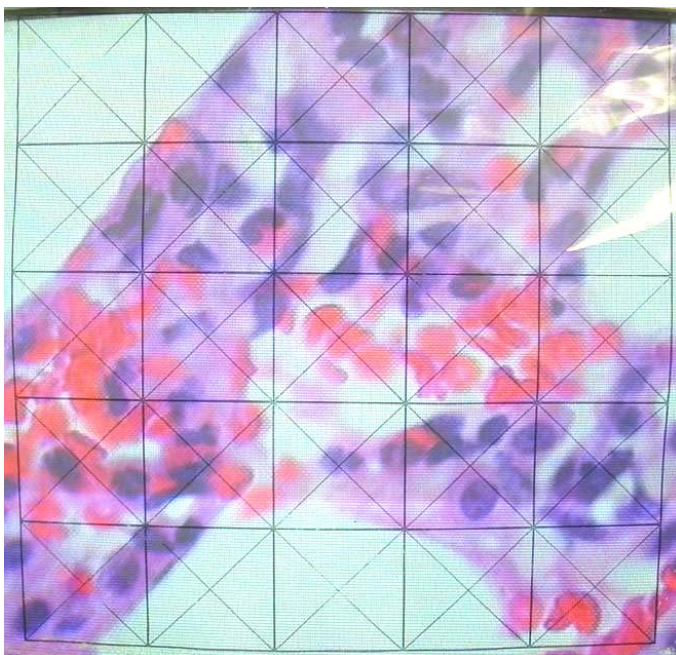


Figura 13. Retículo acoplado ao monitor de vídeo utilizado para contagem do número de neutrófilos por área alveolar para determinação da densidade de neutrófilos

4.5.2.3. Estresse Oxidativo

A avaliação do estresse oxidativo foi realizada por meio da análise da imunoexpressão das isoformas induzida e endotelial da NO sintase.

4.5.2.3.1. Expressão de iNOS

Para a reação imunoistoquímica, antissoro monoclonal contra iNOS de camundongos (IgG2a - iNOS/NOS Type II - N32020 – BD Transduction Laboratories, San Diego, CA) foi utilizado como antisoro primário para as lâminas, que foram incubadas por 24 horas. Após três lavagens por cinco minutos em TBS (“Tris-buffered saline”), as lâminas foram novamente incubadas em anticorpo secundário (LSAB+AP Link Universal, Dako Corp.)

por 30 minutos à 37°C e lavadas novamente por três vezes em TBS. A seguir, foram cobertas com fosfatase alcalina pré-diluída (LSAB + AP - Streptavidin AP - Dako Corp.) e o material, incubado em substrato Fast Red TR (Sigma Chemical Co.) por 6 minutos e corados com hematoxilina levemente por 1 minuto.

A análise da expressão da iNOS foi realizada pela contagem do número de células marcadas por um observador cego com relação ao estudo e com ampla experiência e estudo na área de NO sintase e sua forma induzida. Para tanto, foi utilizado microscópio óptico comum (CH30 Olympus), utilizando-se a técnica do *point counting* com o auxílio de um retículo de 50 retas e 100 pontos, de área conhecida ($10^4\mu\text{m}^2$ no aumento de 1000x), sobreposto à ocular do microscópio. Foram analisados dez campos de alvéolos no aumento de 1000x. Os resultados foram expressos pela média do número de células iNOS positivas nos dez campos por $10^4\mu\text{m}^2$ (Figura 14).

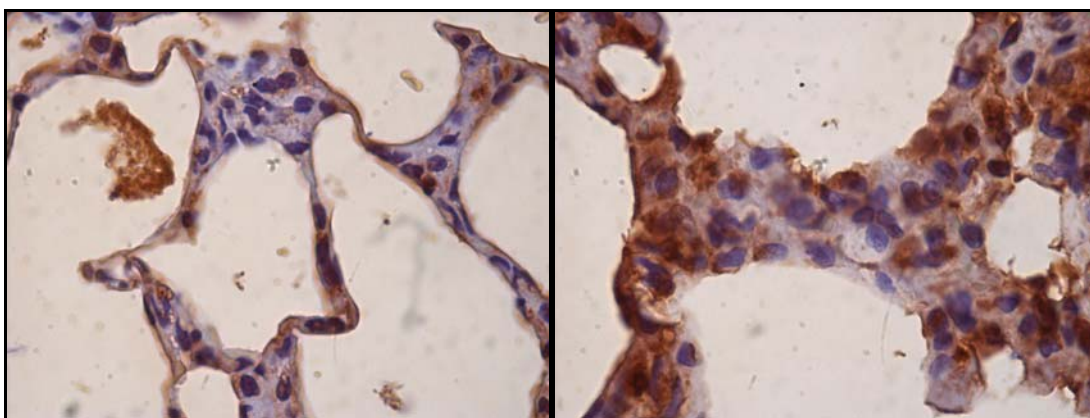


Figura 14. Fotomicrografia de lâminas do lobo inferior direito em aumento de 1000x para análise da expressão de iNOS em células alveolares. Na figura da esquerda, nota-se comparativamente menor expressão

4.5.2.3.2. Expressão de eNOS

Para quantificar a expressão de eNOS foi utilizado o anticorpo monoclonal específico para eNOS (Rb9279p – Neomarkers, Tremont, CA). Inicialmente, as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos à temperatura ambiente com solução bloqueadora seguida do anticorpo monoclonal específico para eNOS. Após três lavagens em TBS por 5 minutos, as lâminas foram incubadas com fosfatase alcalina conjugada (LSAB+AP-Streptavidin AP - Dako Corp., Carpinteria, CA) por 30 minutos à 37°C, e em seguida, novamente incubadas em substrato Fast Red TR por 6 minutos, sendo corados levemente com hematoxilina por 1 minuto.

A expressão da eNOS em células endoteliais da parede vascular foi quantificada pela análise das imagens utilizando um *software* específico (Image Pro Plus v.4.1, 1998, Media Cybernetics, USA). As imagens foram obtidas através de um microscópio Leica DMR (Type 020-525.024, Germany) conectado a uma câmera JVC (TKC1380 Digital Colour Video Camera, Japan) e, por sua vez, ao computador. As análises foram realizadas por observador cego ao estudo e com amplo domínio na análise de eNOS. A área total da parede vascular e a área com positividade para eNOS foram medidas em nove a dez vasos por animal, em aumento de 200x. A área percentual positiva para eNOS foi expressa como a relação entre a área positiva para eNOS e a área total da parede vascular.

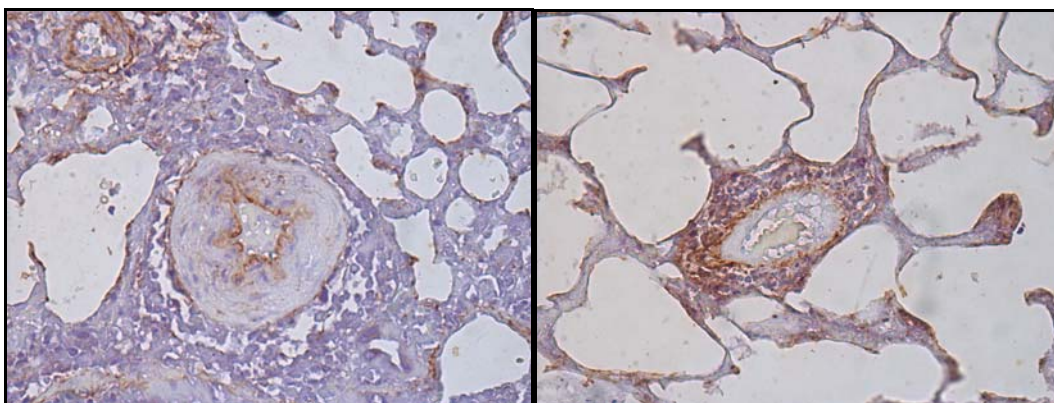


Figura 15. Fotomicrografia de lâminas do lobo inferior direito em aumento de 200x para análise da expressão de eNOS em células endoteliais.

4.5.2.4. Grau de Reatividade Vascular

A relação entre a luz do vaso e a parede da artéria é um dos parâmetros utilizados para analisar o tônus vascular, que é regulado por fatores vasoconstritores e vasodilatadores.

Os vasos para esta análise devem preencher alguns critérios: a) estejam adjacentes aos bronquíolos alveolares e, portanto, possuírem diâmetros semelhantes entre si; b) Representarem uma secção transversal verdadeira, com variação mínima entre o maior e o menor diâmetro do vaso⁶¹.

Baseados nestes parâmetros, foram obtidas 5 a 10 imagens de vasos que foram digitalizados com o emprego do sistema de captura de imagens utilizado anteriormente composto por microscópio, câmera de captura, monitor, placa de captura de imagem e microcomputador. Todas as imagens foram analisadas por dois observadores independentes e cegos em relação à identificação dos animais de cada grupo. Utilizando-se o *software* UTHSCSA Image Tool versão 3.0, a área da luz vascular foi analisada com a

ferramenta de medida de área. A esta medida demos o nome de Área Luminal (AL) e a unidade adotada foi pixels² (Figura 16).

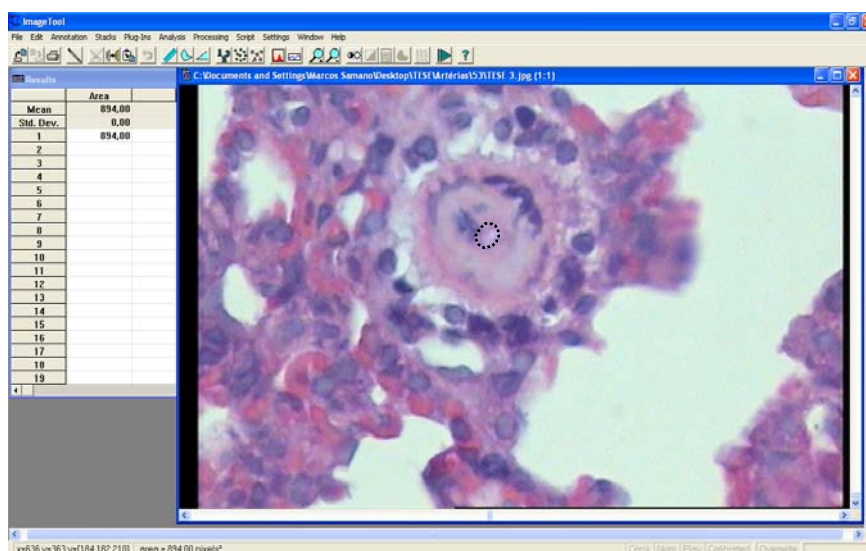


Figura 16. Vaso demonstrando intensa vasoconstricção, com diminuição da luz. A Área Luminal (AL) foi demarcada com auxílio do *software* Image Tool versão 3.0

Para delimitar a espessura da parede do vaso, utilizamos a mesma ferramenta de medida de área, demarcando-se a membrana basal do vaso analisado. Esta medida, igual à utilizada para analisar o Índice de Edema Perivascular, foi denominada AV, cuja unidade também é pixels² (Figura 17). A área da parede do vaso, denominada de Parede Vascular (PV), foi obtida a partir da AV menos a AL.

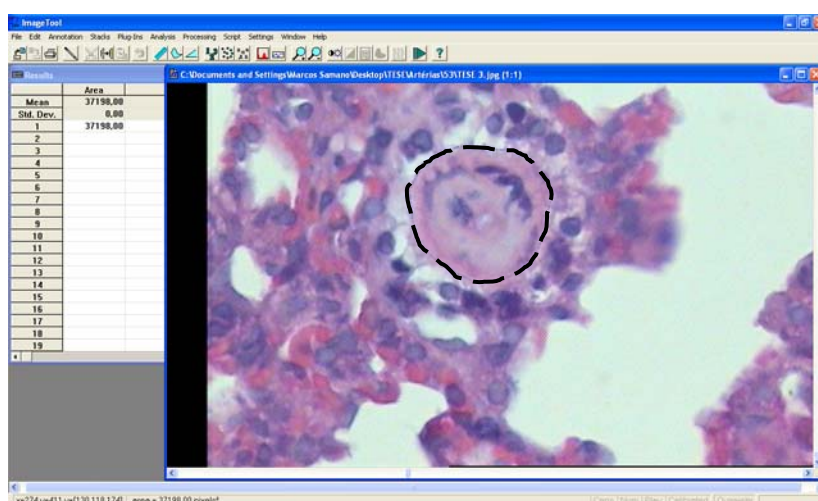


Figura 17. Medida da Área do Vaso (AV), utilizando-se o *software* Image Tool 3.0. Subtraindo-se a AL da AV, temos a Área da Parede Vascular (PV) e a razão AL/PV corresponde à Razão L/P.

A Razão Luz-Parede (Razão L/P) é dada pela seguinte equação e, assim como o IEP, sua unidade é dada em números absolutos:

$$\text{Razão L/P} = \text{PV/AL}$$

Onde: PV = AV-AL

AV = Área do Vaso

AL = Área da Luz do Vaso

Os valores por animal foram expressos pelas médias das Razões L/P de todos os vasos analisados.

4.5.3. Índice Pulmonar (IP)

O ganho de massa pulmonar que ocorre entre a operação e o sacrifício do animal pode estar relacionado ao ganho de massa líquida, sendo uma medida indireta de edema pulmonar. Neste modelo, criou-se um Índice Pulmonar (IP), obtido a partir da relação do peso úmido do pulmão

direito e do peso corpóreo do animal. O Peso do Pulmão (PP) foi obtido através de balança analítica de precisão (Mettler Toledo®) imediatamente após o sacrifício e incluiu a traquéia a partir de seu 1º anel traqueal e o pulmão direito. O Peso Corpóreo (PC) do animal foi obtido imediatamente antes do sacrifício. O IP é dado pela seguinte fórmula e é expresso em números absolutos:

$$IP = PP/PC$$

Onde: PP = Peso do Pulmão direito

PC = Peso Corpóreo do animal, imediatamente antes do sacrifício

Embora estes índices isolados tenham pouco valor, a comparação dos mesmos pode evidenciar diferenças de massa pulmonar. Considerando que não há perda de massa em períodos agudos, o IP dos animais do grupo *sham* corresponde ao controle. Havendo aumento do IP nos animais submetidos à pneumonectomia, pode-se considerar que houve ganho de massa pulmonar total.

4.5.4. Razão Peso Úmido-Peso Seco (Razão U/S)

Outra medida comumente utilizada para a determinação de edema é a razão entre o peso inicial úmido e o peso final, após secagem em estufa. O conjunto traquéia e lobos (superior, médio e retrocava) foi delicadamente pesado em balança analítica Mettler Toledo®, antes do processamento. A este peso denominamos Peso Úmido (PU). Este material foi encaminhado para secagem em estufa (Fanem®) a 56 °C por 72 horas. Após este período,

este material foi novamente pesado para determinação do Peso Seco (PS). A equação para determinação da Razão U/S é dada pela seguinte fórmula e seu valor, também expresso em números absolutos:

$$\text{Razão U/S} = \text{PU/PS}$$

Onde: PU = Peso Úmido

PS = Peso Seco, após secagem em estufa (56°C por 72h)

4.6. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada com auxílio do programa GraphPad para Windows. Os resultados foram analisados com a técnica de análise de variância de duplo fator (*two-way ANOVA*). Os resultados obtidos foram paramétricos e os valores apresentados em média e com o intervalo de confiança de 95%. O nível de significância estabelecido para este estudo foi de 5%.

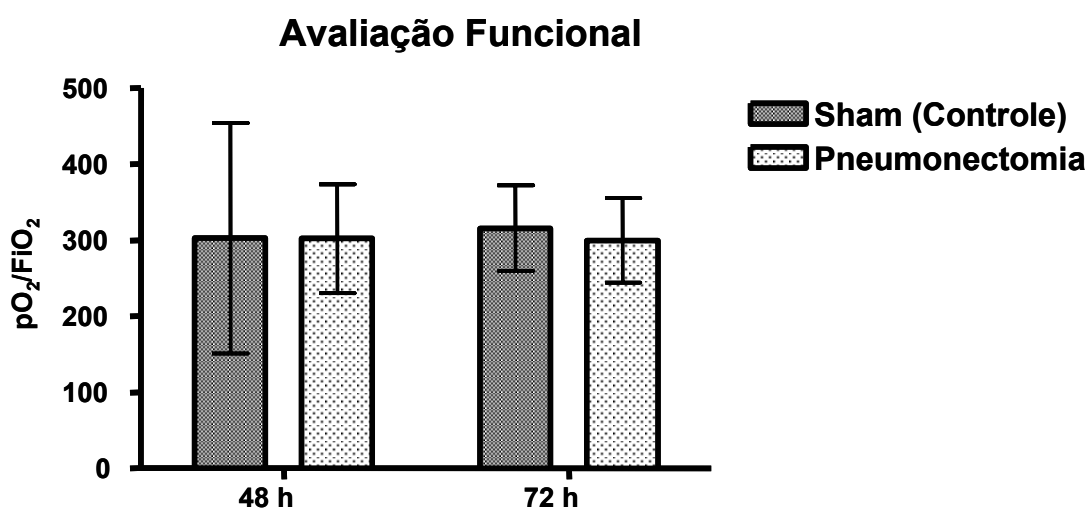
RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1. Avaliação Funcional Pulmonar

Quanto a avaliação funcional pulmonar, os valores médios da pO_2/FiO_2 dos animais submetidos à pneumonectomia e sacrificados em 48 e 72 horas foi de 302,2 e 299,9, respectivamente, enquanto seus controles foram de 302,7 e 315,7. Portanto, não houve diferença significativa quanto ao tratamento, nem em relação ao tempo de observação (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Comparação entre os grupos Pneumonectomia e Controle, sacrificados em 48 e 72 horas, quanto à pO_2 sob ventilação mecânica e oxigênio puro ($FiO_2=1,0$). Não houve diferença entre os grupos.

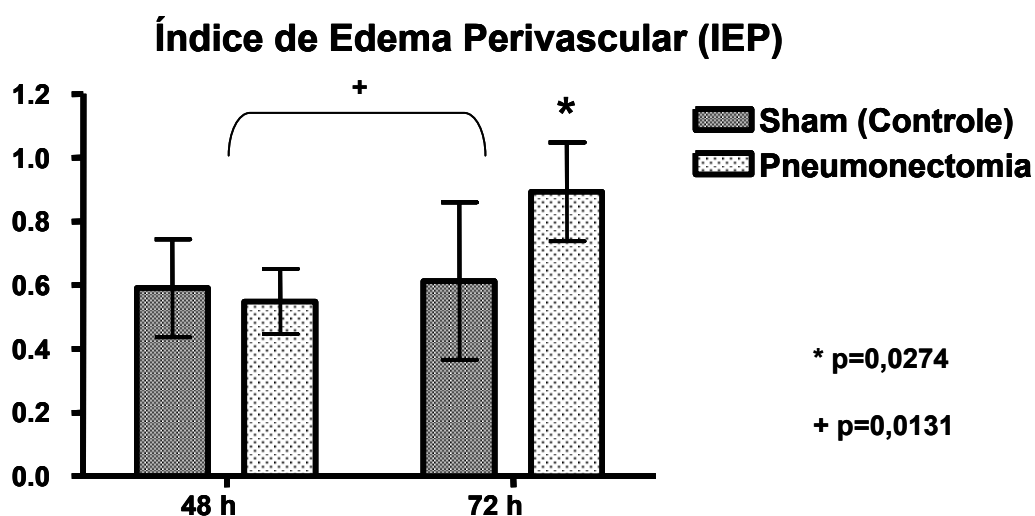


5.2. Avaliação Histológica

5.2.1. Índice de Edema Perivascular (IEP)

Analisando-se o índice de edema perivascular, que analisa o acúmulo de líquido neste espaço, observa-se que há interação entre a intervenção e o tempo, de modo que animais submetidos à pneumonectomia e sacrificados após 72 horas obtiveram maior índice ($p=0,0274$). Animais sacrificados após 72 horas evidenciam maior IEP (0,8925 e 0,6126 para os grupos pneumonectomia e *sham*, respectivamente) do que animais sacrificados em 48 horas (0,5485 e 0,5904). Apesar da interação dos dois fatores, não houve diferença entre os grupos pneumonectomia e *sham* (Gráfico 2).

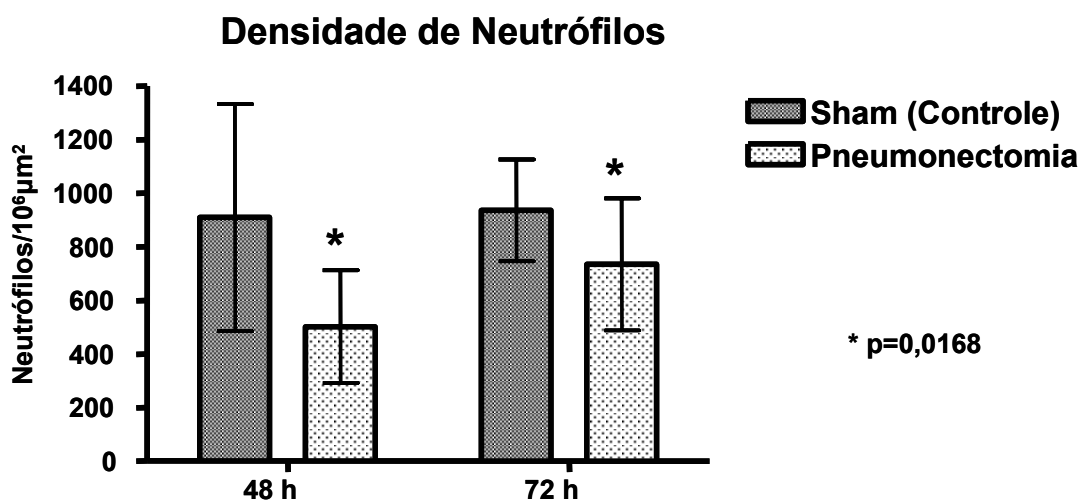
Gráfico 2 – Comparação entre os grupos Pneumonectomia e Controle, sacrificados em 48 e 72 horas, quanto ao Índice de Edema Perivascular (IEP). Houve interação entre a pneumonectomia e o tempo de sacrifício ($p=0,0274$). Houve diferença quanto ao tempo e não houve diferença quanto ao tratamento.



5.2.2. Infiltrado Inflamatório

Animais submetidos à pneumonectomia tiveram menor infiltrado inflamatório do que seus respectivos grupos *sham* ($p=0,0168$). A densidade média de neutrófilos para animais submetidos à pneumonectomia foi igual a 501,6 e 734,7 neutrófilos/ $10^6\mu\text{m}^2$, para o sacrifício em 48 e 72 horas. Já no grupo Sham, a densidade média foi de 909,1 e 935,9 neutrófilos/ $10^6\mu\text{m}^2$. Não houve diferença quanto ao tempo (Gráfico 3).

Gráfico 3 – Comparação entre os grupos Pneumonectomia e Controle, sacrificados em 48 e 72 horas, quanto à Densidade de Neutrófilos. Houve diferença quanto ao tratamento, com ratos submetidos à pneumonectomia apresentando menor densidade de neutrófilos. Não houve diferença quanto ao tempo.

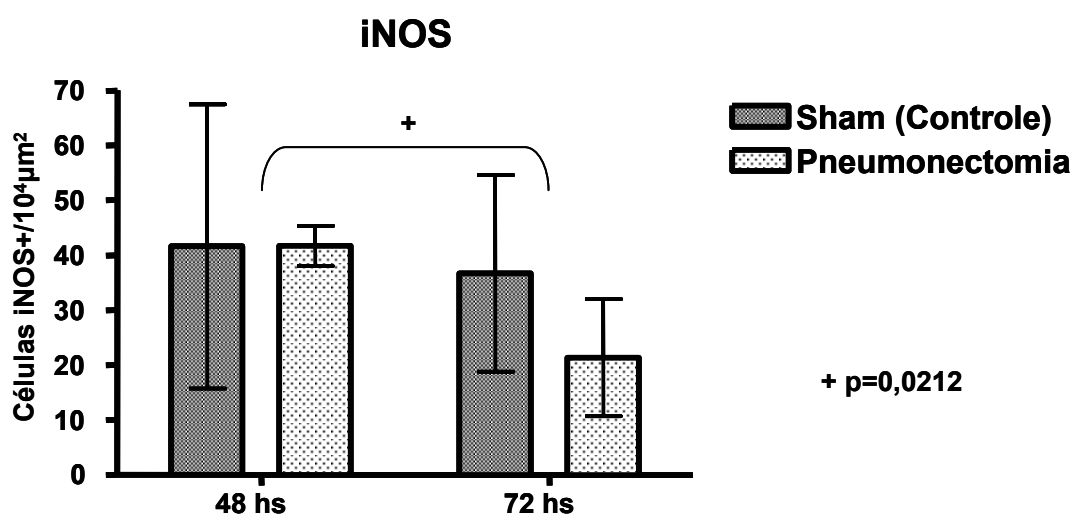


5.2.3. Estresse Oxidativo

5.2.3.1. Expressão de iNOS

O número médio de células alveolares marcadas com iNOS para animais sacrificados em 48 horas foi de 41,65 e 41,63 células/ $10^4\mu\text{m}^2$ para os grupos pneumonectomia e *sham*, respectivamente. No grupo de animais sacrificados após 72 horas, o valor foi de 21,32 e 36,65 células/ $10^4\mu\text{m}^2$, respectivamente. Embora animais submetidos à pneumonectomia e sacrificados em 72 horas tenham obtido a menor expressão de iNOS, não houve diferença entre os grupos pneumonectomia e *sham*. Houve diferença quanto ao tempo, sendo que nos dois grupos de intervenção, a expressão imunohistoquímica de iNOS após 72 horas foi menor, como pode-se observar no gráfico 4 ($p=0,0212$).

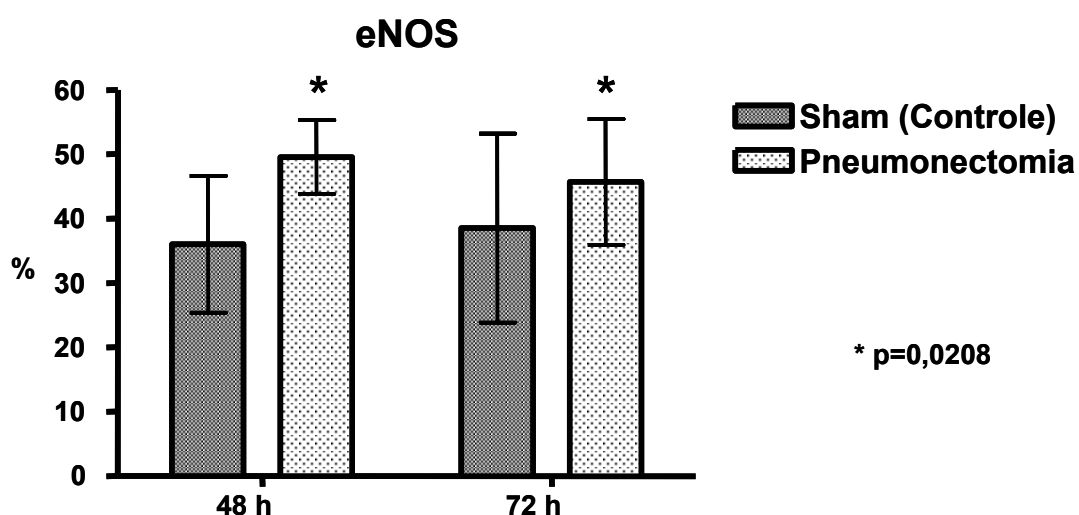
Gráfico 4 – Comparação entre os grupos Pneumonectomia e Controle, sacrificados em 48 e 72 horas, quanto à expressão de iNOS por células no parênquima pulmonar. Não houve diferença quanto ao tratamento. Houve diferença quanto ao tempo ($p=0,0212$).



5.2.3.2. Expressão de eNOS

A área percentual positiva para eNOS foi maior nos animais submetidos à pneumonectomia, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($p=0,0208$). Conforme observa-se no gráfico 8, a área percentual positiva foi de 49,57 e 45,70 nos animais submetidos à pneumonectomia e sacrificados em 48 e 72 horas, enquanto que no grupo Sham, estes valores foram de 36,01 e 38,50, respectivamente. Não houve diferença significativa relacionada ao tempo de sacrifício (Gráfico 5).

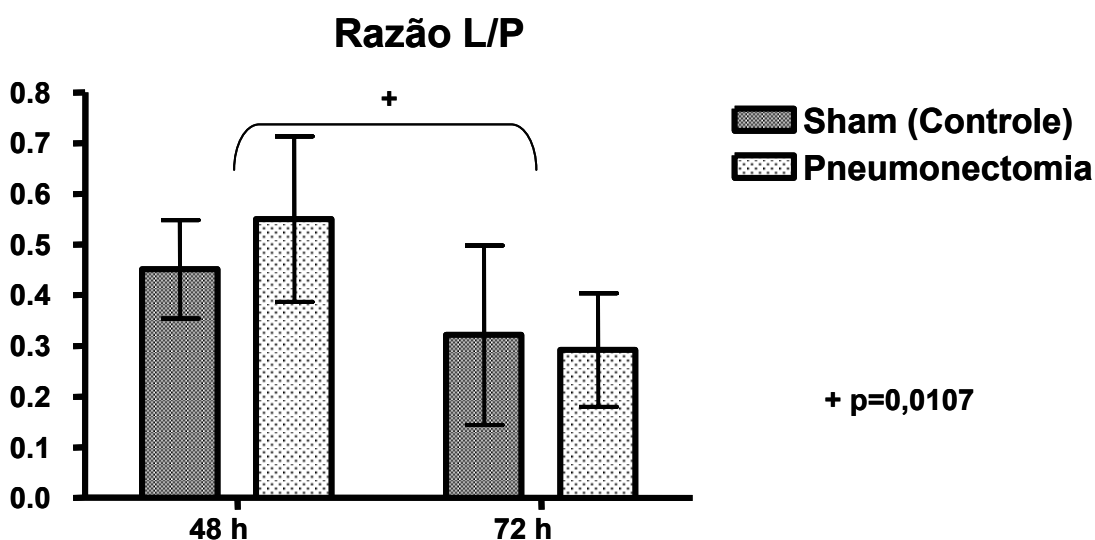
Gráfico 5 – Comparação entre os grupos Pneumonectomia e Controle, sacrificados em 48 e 72 horas, quanto à expressão de eNOS. Houve diferença quanto ao tratamento, com maior expressão de eNOS nos animais submetidos à pneumonectomia ($p=0,0208$).



5.2.4. Grau de Reatividade Vascular

A Razão L/P dos animais submetidos à pneumonectomia não foi diferente dos animais do grupo Sham. Contudo esta diferença foi significativo no tempo, evidenciando valores menores nos animais sacrificados após 72 horas ($p=0,0107$). Para o grupo Pneumonectomia os valores da Razão L/P foram de 0,5503 e 0,2921, para sacrifícios em 48 e 72 horas, respectivamente. No grupo Sham, estes valores foram de 0,4516 e 0,3213 (Gráfico 6).

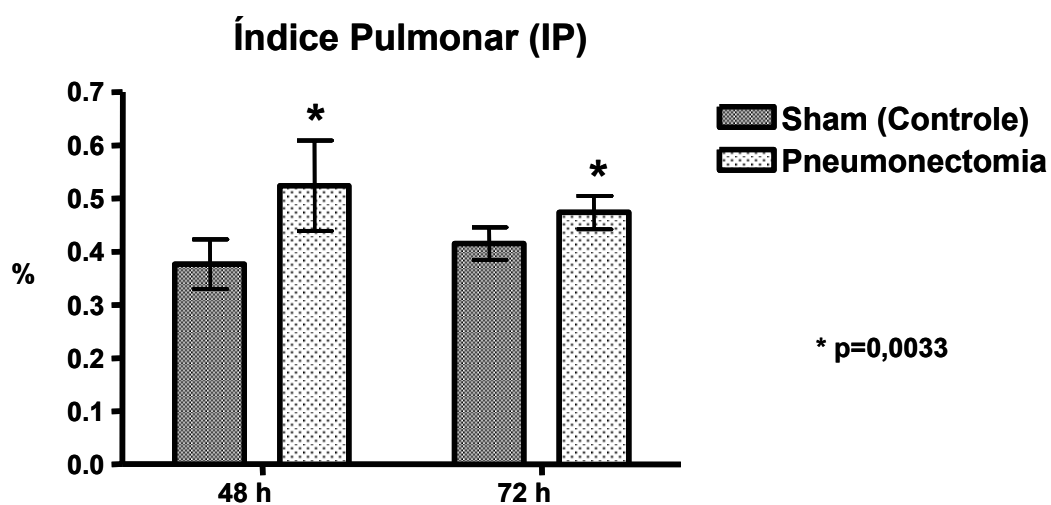
Gráfico 6 – Comparação entre os grupos Pneumonectomia e Controle, sacrificados em 48 e 72 horas, quanto à Razão L/P. Houve diferença quanto ao tempo, com a Razão L/P menor nos animais sacrificados após 72 horas.



5.3. Índice Pulmonar (IP)

Os animais submetidos à pneumonectomia tiveram maior índice pulmonar (0,5238% e 0,4733%, para 48 e 72 horas) do que os animais controle (0,3762% e 0,4151%), sendo $p=0,0033$. Isto representa um ganho de massa proporcional obtido após a operação. Esta diferença não foi significativa com o tempo (Gráfico 7).

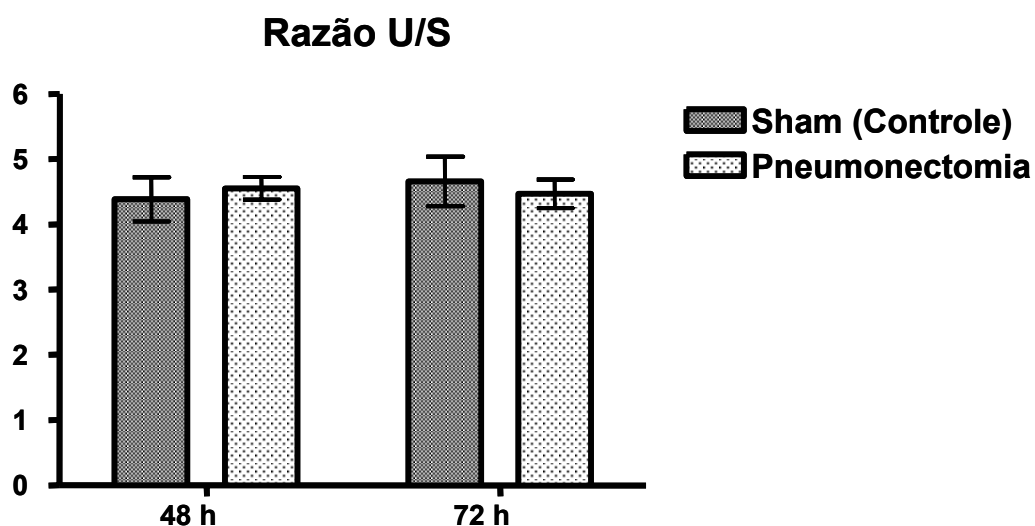
Gráfico 7 – Comparação entre os grupos Pneumonectomia e Controle, sacrificados em 48 e 72 horas, quanto ao Índice Pulmonar (IP). Houve diferença quanto ao tratamento, com maior índice pulmonar nos animais submetidos à pneumonectomia ($p=0,0033$).



5.3.1. Razão Peso Úmido-Peso Seco (Razão U/S)

Utilizando-se a razão entre os pesos úmido e seco, observou-se que a razão média para animais sacrificados em 48 horas foi de 4,553 para o grupo pneumonectomia e de 4,383 no grupo Sham. Entre os animais sacrificados após 72 horas da operação, razão média foi de 4,467 e 4,659, respectivamente. Não houve diferença significativa entre estes grupos, como se pode observar no Gráfico 8.

Gráfico 8 – Comparação entre os grupos Pneumonectomia e Controle, sacrificados em 48 e 72 horas, quanto à Razão U/S. Não houve diferença quanto ao tratamento, nem quanto ao tempo.



DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Com o desenvolvimento de métodos diagnósticos radiológicos mais eficientes, notadamente a tomografia computadorizada, e a detecção de tumores cada vez menores, o índice de cura e sobrevida do carcinoma pulmonar vem aumentando nas últimas décadas. Desde a implantação do sistema TNM para o estadiamento do câncer de pulmão, na década de 1970, quando a sobrevida aos cinco anos nos tumores ditos precoces era de aproximadamente 60%⁶², ensaios clínico-cirúrgicos multicêntricos vêm mostrando que a sobrevida pode ser melhor se houver diagnóstico precoce e tratamento adequado. Atualmente, a sobrevida pode chegar a 100% em pacientes portadores de lesão menor do que 1 cm⁶³.

A detecção de tumores menores coloca em discussão a possibilidade de preservação do parênquima pulmonar, utilizando também ressecções menores como a segmentectomia no tratamento do carcinoma de pulmão. No entanto, a lobectomia permanece como o tratamento padrão, conforme publicado por Smythe⁶⁴, em sua metanálise de 2003. De encontro a estas afirmações, qual a papel atual da pneumonectomia?

No período de 1988 a 2002, foram realizadas 512.758 ressecções pulmonares nos EUA, sendo 13% correspondentes a pneumonectomias⁶⁵. Embora tenha ocorrido pequeno decréscimo ao longo do tempo, ainda assim, corresponde a mais de 10% do total de ressecções. Conclui-se que

esta operação permanece no arsenal terapêutico do cirurgião torácico como uma alternativa técnica nos tumores localizados centralmente, nas doenças infecto-inflamatórias e nos transplantes pulmonares.

As alterações fisiológicas que ocorrem após a realização de uma pneumonectomia em um indivíduo previamente normal não estão bem esclarecidas sob todos os aspectos. Segundo estudos clínicos, a contribuição do pulmão direito para a função pulmonar total é de 53 a 55%, enquanto que o pulmão esquerdo contribui com 45 a 47%¹. Há declínio das provas funcionais após a pneumonectomia e este declínio depende basicamente do lado da pneumonectomia, da idade do paciente e da função do pulmão remanescente. A CVF e o VEF₁ geralmente diminuem menos do que 50% do valor inicial. Não há alteração da saturação arterial de oxigênio, pO₂ ou pCO₂, mas o consumo máximo de oxigênio pode diminuir de 17 a 28% após a ressecção pulmonar¹.

Analisando-se o efeito da pneumonectomia sobre a avaliação funcional pulmonar, por meio da relação da pO₂ e FiO₂, não observamos diminuição desta relação nos animais submetidos à operação. Embora esta análise tenha sido realizada com os animais sob ventilação mecânica, a diminuição do parênquima pulmonar não afetou este parâmetro gasométrico. Ainda assim, deve-se recordar que a perda de parênquima pulmonar de ratos submetidos a pneumonectomia esquerda é ainda menor do que no ser humano, pois nestes animais, o pulmão esquerdo corresponde a apenas 35% da massa pulmonar total⁵⁰.

Não obstante à manutenção dos parâmetros ventilatórios no status pós-pneumonectomia, esta é uma operação com alto índice de morbimortalidade. Cabe ressaltar que a taxa de mortalidade relacionada às ressecções pulmonares é uma das maiores entre todos os procedimentos cirúrgicos, chegando a 70% nas pneumonectomias por traumatismo torácico⁶⁶.

Watanabe et al.⁶⁷, em análise da mortalidade pós-operatória relacionada às ressecções por carcinoma broncogênico no *National Cancer Center Hospital* de Tóquio, mostrou mortalidade cerca de dez vezes maior nas pneumonectomias do que nas lobectomias. Em levantamento realizado no Serviço de Cirurgia Torácica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, no período de 1993 a 2003, a taxa de mortalidade desta operação revelou-se alta (15,2%), muito maior à direita (27% contra 8,6%), sendo o edema pulmonar a principal causa associada (29%)^{**}.

Fernández-Pérez et al.⁶⁸, analisando retrospectivamente 170 pacientes submetidos a pneumonectomia na Clínica Mayo, observaram 18% de insuficiência respiratória aguda, sendo metade destas relacionadas à lesão pulmonar aguda ou EPP. Levando-se em consideração apenas dados norte-americanos, onde são realizadas anualmente cerca de 4500 pneumonectomias, aproximadamente 10% dos pacientes desenvolverão lesão pulmonar aguda com necessidade de assistência ventilatória mecânica. Sabendo-se da alta taxa de mortalidade associada a esta

^{**} Dados do autor

complicação, pode-se extrapolar que aproximadamente 250 pacientes morrerão por ano nos EUA por EPP.

Reproduzir lesões pulmonares em animais de experimentação tem sido objeto de muitos estudos. A maioria destes busca reproduzir a SDRA pela lavagem pulmonar com solução salina ou endotoxina de *Escherichia coli*^{69,70}. Em ratos, a infusão de endotoxina (lipopolissacáride), seja intratraqueal ou endovenosa pode reproduzir lesão pulmonar aguda^{71,72}. Já em relação ao EPP, somente Zeldin et al.²⁹ conseguiram reproduzir um efeito semelhante com a infusão de grande quantidade de líquidos em cães submetidos à pneumonectomia. Desenvolver um modelo que represente esta afecção representa um importante passo para buscar formas de prevenção e tratamento eficazes.

O ganho agudo de massa pulmonar pode estar relacionado à formação de edema pulmonar. A relação peso do pulmão sobre o peso corpóreo foi descrita por Staub *apud* Rothchild et al.⁷³ como parâmetro para análise de edema pulmonar e, neste trabalho, esta relação foi denominada de Índice Pulmonar (IP). Observou-se maior IP nos animais operados, representando ganho agudo proporcional de massa pulmonar e sugerindo haver acúmulo de líquido extravascular após a pneumonectomia.

Entretanto, analisando-se o edema pulmonar a partir do ganho de água por meio da análise do peso úmido e do peso seco (Razão U/S), não observou-se maior razão nos animais operados, isto é, não parece ter havido ganho de massa líquida. A ausência de correlação entre o IP e a Razão U/S pode sugerir que o ganho de massa pulmonar evidenciado pelo

primeiro índice não esteja relacionado ao ganho de água extravascular, mas à migração de células inflamatórias ou ao crescimento compensatório decorrente do remodelamento pulmonar. Outra possibilidade é que o edema pulmonar seja discreto e não pode ser evidenciado grosseiramente pelas medidas adotadas.

O crescimento compensatório, por outro lado, embora inicie-se imediatamente após a operação, permanece estável nas primeiras 48 horas. A massa pulmonar total é restabelecida em aproximadamente 14 dias⁵⁰. Os elementos que sinalizam para o início do crescimento compensatório pulmonar são a hiperinsuflação do pulmão remanescente e o aumento do fluxo sangüíneo, causando distensão do tecido pulmonar e da vasculatura pulmonar.

O espaço perivascular em pequenos animais, formado por capilares e tecido conjuntivo, pode apresentar infiltração de leucócitos em diversas situações, como reações inflamatórias e alérgicas. Seu papel, embora negligenciado durante muito tempo devido ao enfoque dos outros compartimentos pulmonares (interstício, espaço bronco-alveolar e lâmina própria dos brônquios), parece também estar intimamente relacionado ao acúmulo de líquido no edema pulmonar destes animais^{74,75}. É nesse espaço que ocorre a rápida migração de eosinófilos nos modelos experimentais de asma⁷⁶.

A análise histológica do parênquima pulmonar remanescente através do IEP revelou interação entre a pneumonectomia esquerda e o momento do sacrifício, mostrando que maior é o edema perivascular nos animais

submetidos à pneumonectomia e sacrificados após 72 horas. Desse modo, observou-se que a realização da operação foi suficiente para acarretar extravasamento perivascular, sendo maior após 72 horas do procedimento. Havendo extravasamento e, portanto, quebra da barreira alvéolo-capilar, qual seria o fator predominante na gênese deste processo?

Na formação do edema pulmonar através de mecanismos inflamatórios isolados, os neutrófilos desempenham papel fundamental. A marginação leucocitária que ocorre após uma lentificação do fluxo sangüíneo nos capilares decorrente do aumento da permeabilidade vascular, segue com aderência e transmigração, quimiotaxia e ativação dos leucócitos. Todas estas etapas são intrincadas e dependentes de moléculas de aderência e de interleucinas, e tem o objetivo de ativar os leucócitos promovendo fagocitose e degranulação de enzimas lisossômicas, iniciando o estresse oxidativo⁷⁷. Assim, a presença de neutrófilos no tecido alveolar é um marcador de inflamação aguda, sendo um sinal indireto de aumento da permeabilidade vascular por lesão endotelial.

Kondo et al.⁷⁸, analisando 16 pacientes submetidos a ressecção pulmonar por carcinoma, mostraram uma associação entre a quantidade de água pulmonar extravascular, medida através de termodiluição e a presença de elastase neutrofílica, uma enzima que catalisa a hidrólise de proteínas. A sua presença indica atividade neutrofílica e, neste estudo, sugeriu que o edema pulmonar está associado a esta atividade.

Acreditando no dano endotelial causado pela ressecção pulmonar como etiologia do EPP, Cerfolio et al.⁷⁹ idealizaram um estudo prospectivo

administrando doses suprafarmacológicas de metilprednisolona (250mg de Solu-medrol®) em pacientes submetidos a pneumonectomia. Quando comparado com seu grupo controle, histórico e retrospectivo, observaram que o uso do corticóide diminuiu a incidência de EPP.

Contudo, contrapondo-se às informações dos dois artigos anteriores, este trabalho mostrou uma diminuição do infiltrado inflamatório medido pela densidade de neutrófilos alveolares nos animais submetidos à pneumonectomia. Estas informações sugerem que houve bloqueio do processo inflamatório com inibição da quimiotaxia dos neutrófilos.

Não se sabe ao certo o papel desenvolvido pelos neutrófilos na etiologia da SDRA e do EPP. Porém, a ativação dos mesmos nos processos pulmonares agudos pode acarretar na liberação de grandes quantidades de radicais livres, ocasionando estresse oxidativo e culminando na Lesão Pulmonar Aguda (LPA). Estudos acerca do papel desempenhado pelas isoformas de NOS após a pneumonectomia são escassos. Em relação à SDRA, Farley et al.⁸⁰ mostraram a associação da iNOS dependente de macrófagos alveolares a LPA/SDRA. De maneira semelhante, Ren et al.⁸¹, utilizando um modelo experimental de LPA induzida por uma proteína denominada *high mobility group box 1* (HMGB1), mostraram que a extensão da lesão pulmonar foi diretamente proporcional à produção de NO, havendo relação direta entre os macrófagos alveolares, a expressão pelos mesmos de iNOS e a concentração de NO como causa da LPA induzida pelo HMGB1. A expressão histológica da iNOS através de marcação

imunoistoquímica e sua relação com a inflamação alérgica crônica das vias aéreas foi descrita por Prado et al.⁸².

Utilizando a técnica de *point-counting* e a análise da expressão tecidual imunoistoquímica da iNOS relatada no estudo anterior e desenvolvida pelo Laboratório de Terapêutica Experimental da FMUSP observou-se que a pneumonectomia não elevou a expressão tecidual de iNOS, sugerindo não estar associada a estresse oxidativo. Houve diminuição de sua expressão após 72 horas da intervenção, tanto nos animais submetidos à pneumonectomia como naqueles submetidos à operação tipo Sham.

Analisando-se a expressão imunoistoquímica da eNOS em células endoteliais, observou-se que houve interação da pneumonectomia em sua expressão, tanto em 48 como 72 horas, estando expressas em maior quantidade do que nos animais dos grupos controle. A associação da eNOS e a pneumonectomia foi relatada somente em dois trabalhos. Leuwerke et al.⁸³ analisaram o crescimento compensatório do pulmão após a ressecção pulmonar em ratos portadores de deficiência de eNOS, evidenciando que esta fração da NOS é fundamental para o crescimento compensatório. Maxey et al.⁸⁴ avaliaram o efeito da pneumonectomia sobre a pressão de artéria pulmonar em camundongos portadores de deficiência de eNOS, mostrando que a normalização da pressão por meio da vasodilatação é dependente do NO produzido a partir da eNOS.

Sob este aspecto, pode-se inferir que a eNOS seria responsável pela normalização da pressão de artéria pulmonar e do crescimento

compensatório pulmonar. Seu aumento nos animais submetidos à operação teria a função de vasodilatação compensatória, pelo aumento da produção de NO endógeno, assim como efeito protetor na síndrome de isquemia e reperfusão.

Embora ensaios experimentais e clínicos não tenham demonstrado aumento sustentado da pressão de artéria pulmonar após uma pneumonectomia, sabe-se que ele ocorre nos momentos iniciais após a ligadura da artéria pulmonar, com normalização destes valores poucas horas após o procedimento. Apesar de haver aumento do volume diastólico final do ventrículo direito, não ocorre diminuição do débito cardíaco e o pulmão remanescente recebe todo o volume sangüíneo, antes destinado aos dois pulmões. O aumento da resistência vascular pulmonar é uma consequência passiva deste aumento do fluxo sangüíneo. Por outro lado, durante o exercício físico há aumento da pressão de artéria pulmonar e diminuição do débito cardíaco⁸⁵. A adaptação dos vasos de pequeno calibre frente às alterações pressóricas causadas pela pneumonectomia é desconhecida e pode estar relacionada à gênese do EPP, na medida em que o aumento da resistência vascular pulmonar cause estresse sobre o endotélio e ruptura das junções celulares, ocasionando extravazamento de líquido para o interstício.

Batalha et al.⁶¹, em modelo experimental em ratos, mostraram que a vasoconstrição pulmonar causada pela exposição aguda a poluentes atmosféricos poderia ser analisada pela relação entre a luz do vaso e sua parede (Razão L/P). O conceito desta medida é baseado nos mecanismos

pelos quais vasos de pequeno calibre podem se estreitar: (a) hipertrofia muscular, (b) constrição vascular ou (c) ambos. O aumento da espessura da camada muscular está relacionado à hipertensão pulmonar, sendo uma medida descrita e aceita. Alterações nesta razão em períodos evolutivos de 72 horas estão relacionados à vasoconstrição e não à hipertrofia muscular.

Animais submetidos à pneumonectomia não demonstraram grau de reatividade vascular se comparados ao seus respectivos controles (Sham). Entretanto, houve maior vasoconstrição após 72 horas em ambos os grupos. Como a elevação da pressão de artéria pulmonar sofre aumento apenas no período peri-operatório, é possível inferir que ocorra vasodilatação pulmonar inicialmente, para que ocorra adaptação ao maior fluxo sangüíneo, seguida de reatividade vascular às custas de vasoconstrição, justificando o aumento da resistência vascular pulmonar observada em alguns estudos. Quanto à diferença temporal observada nos grupos controle, é possível que o trauma anestésico e operatório seja suficiente para influenciar na reatividade vascular.

Embora a etiologia do EPP não esteja completamente esclarecida, isto não impediu que tratamentos empíricos fossem instituídos na tentativa de salvar pacientes acometidos. A partir da descoberta do NO como fator de relaxamento derivado do endotélio, este vem sendo largamente empregado em terapia intensiva, mesmo sabendo do efeito deletério causado pelas grandes quantidades de NO liberado a partir da isoforma iNOS por estimulação inflamatória. Mathisen et al.⁸⁶, em estudo retrospectivo, analisaram uso de NO em pacientes que evoluíram com SDRA após

ressecção pulmonar, concluindo que o seu uso teve repercussão positiva nos pacientes, com melhora da relação pO_2/FiO_2 e do índice de mortalidade. Rabkin et al.⁸⁷ também tiveram sucesso utilizando NO no tratamento de um paciente submetido à pneumonectomia e que desenvolveu insuficiência respiratória aguda. Contrário ao efeito benéfico do NO no EPP, Filatre et al.⁸⁸ observaram que o uso intra-operatório de NO em porcos submetidos à pneumonectomia causou maior atividade inflamatória e piora da oxigenação arterial, sem que houvesse diferença na concentração de água extravascular, concluindo que o uso do NO não deve ser recomendado para prevenir a ocorrência de EPP.

Os estudos efetuados, tendo como parâmetro a troca gasosa medida pela pO_2/FiO_2 , sugerem que a pneumonectomia esquerda não leva à perda funcional pulmonar. A análise do edema pulmonar evidencia que há ganho de massa pulmonar proporcional após a pneumonectomia tanto após 48 como 72 horas de sacrifício. Contudo, este dado não é corroborado pela análise do peso úmido e do peso seco, que indica que o ganho observado não se dá às custas de massa líquida. A análise do espaço perivascular, que é o compartimento pulmonar primordial na homeostase do líquido extravascular, evidencia presença de edema perivascular, decorridas 72 horas de sacrifício nos animais submetidos à pneumonectomia.

Na busca da gênese do edema decorrente da pneumonectomia, observou-se que não há aumento do infiltrado inflamatório após a pneumonectomia, sugerindo não haver relação a processo inflamatório decorrente da ressecção pulmonar. De maneira análoga, não há estresse

oxidativo associado, uma vez que a expressão tecidual de iNOS permanece nos mesmos níveis dos animais do grupo Sham, diminuindo em ambos os grupos após 72 horas.

A expressão da eNOS pelas células endoteliais está mais elevada nos animais submetidos à pneumonectomia, possivelmente em decorrência da ativação dos fatores de estresse endoteliais. Sabendo-se que a pneumonectomia leva ao aumento transitório da pressão de artéria pulmonar, aumento do volume diastólico final do ventrículo direito e aumento da resistência vascular pulmonar, é possível inferir que ocorra estresse sobre o endotélio e o aumento da expressão de eNOS seja um mecanismo compensatório para aumentar a produção de NO endógeno levando à vasodilatação compensatória.

Contudo, a análise do grau de reatividade vascular, evidencia que não há diferença entre animais submetidos à pneumonectomia e animais submetidos à operação tipo Sham. Decorridas 72 horas das intervenções, houve diminuição da Razão L/P sugerindo haver vasoconstrição após este período. Sua relação com o aumento da expressão tecidual de eNOS não pode ser estabelecida neste modelo experimental. É possível que haja um esgotamento da resposta vasodilatadora ao NO, ou que ocorra lesão endotelial irreversível com vasoconstrição reflexa. A fim de corroborar com estes dados, novos estudos devem ser realizados com o intuito de estudar o comportamento pressórico de câmaras cardíacas direitas e sua relação à expressão de eNOS.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

Baseados nos resultados, concluímos que a pneumonectomia esquerda em ratos não causou alterações funcionais, mas causou alterações histológicas. Quanto a estas alterações, não foram de natureza inflamatória e nem relacionadas ao estresse oxidativo. Foram caracterizadas por edema perivascular e vasoconstrição, observados após 72 horas da operação.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

-
- ¹ Kopec SE, Irwin RS, Umali-Torres CB, Balikian JP, Conlan AA. The Postpneumectomy State. *Chest*. 1998;114:1158-84.
 - ² Wilkins EW Jr, Scannell JG, Craver JG. Four decades of experience with resections for bronchogenic carcinoma at the Massachusetts General Hospital. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1978 Sep;76(3):364-8.
 - ³ Wahi R, McMurtrey MJ, DeCaro LF, Mountain CF, Ali MK, Smith TL, Roth JA. Determinants of perioperative morbidity and mortality after pneumectomy. *Ann Thorac Surg*. 1989 Jul;48(1):33-7.
 - ⁴ Harpole DH, Liptay MJ, DeCamp MM Jr, Mentzer SJ, Swanson SJ, Sugarbaker DJ. Prospective analysis of pneumectomy: risk factors for major morbidity and cardiac dysrhythmias. *Ann Thorac Surg*. 1996 Mar;61(3):977-82.
 - ⁵ Zwischenberger JB, Alpard SK, Bidani A. Early complications. Respiratory failure. *Chest Surg Clin N Am*. 1999;9(3):543-64.
 - ⁶ Algar FJ, Alvarez A, Salvatierra A, Baamonde C, Aranda JL, López-Pujol FJ. Predicting pulmonary complications after pneumectomy for lung cancer. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003;23(2):201-8.
 - ⁷ Scielo.org [homepage on the Internet]. Available from: <http://www.scielo.br/cgi-bin/wxis.exe/iah/>. Acessado em 02/11/2007.
-

-
-
- ⁸ Samano MN, Sancho LMM, Beyruti R, Jatene FB. Postpneumectomy pulmonary edema. J. Bras. Pneumol. 2005;31(1):69-75.
- ⁹ Pubmed.gov [homepage on the Internet]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed&cmd=search&term=postpneumectomy+pulmonary+edema>. Acessado em 02/11/2007.
- ¹⁰ Bireme.br [homepage on the Internet]. Available from: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/>. Acessado em 02/11/2007.
- ¹¹ Gibbon JH, Gibbon MH. Experimental Pulmonary Edema Following Lobectomy and Plasma Infusion. Surgery. 1942;12:694-704.
- ¹² Shapira OM, Shahian DM. Postpneumectomy Pulmonary Edema. Ann Thorac Surg. 1993;56:190-5.
- ¹³ Deslauriers J, Aucoin A, Grégoire J. Postpneumectomy Pulmonary Edema. Chest Surg Clin N Am. 1998;8:611-31.
- ¹⁴ van der Werff YD, van der Houwen HK, Heijmans PJM, Duurkens VAM, Leusink HA, van Heesewijk HPM, de Boer A. Postpneumectomy Pulmonary Edema. A Retrospective Analysis of Incidence and Possible Risk Factors. Chest. 1997;111:1278-84.
- ¹⁵ Deslauriers J, Aucoin A, Grégoire J. Postpneumectomy Pulmonary Edema. Chest Surg Clin N Am. 1998;8:611-31.
- ¹⁶ Parquin F, Marchal M, Mehiri S, Hervé P, Lescot B. Post-pneumectomy Pulmonary Edema: Analysis and Risk Factors. Eur J Cardiothorac Surg. 1996;10:929-933.
-
-

-
-
- ¹⁷ Turnage WS, Lunn JJ. Postpneumonectomy Pulmonary Edema. A Retrospective Analysis of Associated Variables. *Chest*. 1993;103:1646-50.
- ¹⁸ Slinger P. Post-pneumonectomy pulmonary edema: is anesthesia to blame? *Curr Opin Anaesthesiol*. 1999;12(1):49-54.
- ¹⁹ Waters PF. Pneumonectomy. In: Pearson FG, Hiebert CA, Deslauriers J, McKneally MF, Ginsberg RJ, Hurschel HC Jr, editores. *Thoracic Surgery*. New York: Churchill Livingstone; 1995. p.844-8.
- ²⁰ Graham EA, Singer JJ. Successful Removal of an Entire Lung for Carcinoma of the Bronchus. *JAMA*. 1933;101:1371-4.
- ²¹ Baue AE. Evarts A. Graham and the First Pneumonectomy. *JAMA*. 1984;251:261-4.
- ²² Fuentes PA. Pneumonectomy: Historical Perspective and Prospective Insight. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2003;23:439-45.
- ²³ Churchill ED, Sweet RH, Soutter L, Scannell JG. The Surgical Management of Carcinoma of the Lung. A Study of the Cases Treated at the Massachusetts General Hospital from 1930 to 1950. *J Thorac Surg*. 1950;20:349-65.
- ²⁴ Martini N, Ginsberg RJ. Lobectomy. In: Pearson FG, Hiebert CA, Deslauriers J, McKneally MF, Ginsberg RJ, Hurschel HC Jr, editors. *Thoracic Surgery*. New York: Churchill Livingstone; 1995. p:848-54.
- ²⁵ Deslauriers J, Gregoire J. Surgical Therapy of Early Non-Small Cell Lung Cancer. *Chest*. 2000;117:104S-109S.
- ²⁶ Dicionário eletrônico Houaiss da língua portuguesa [CD-ROM]. São Paulo: Objetiva; 2001.
-
-

-
-
- ²⁷ Fell SC. A Brief History of Pneumonectomy. *Chest Surg Clin N Am.* 2002;12:541-63.
- ²⁸ Mathru M, Blakeman BP. Don't Drown the "Down Lung". *Chest.* 1993;103:1644-5.
- ²⁹ Zeldin RA, Normandin D, Landtwin D, Peters RM. Postpneumonectomy Pulmonary Edema. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1984;87:359-65.
- ³⁰ Slinger PD. Perioperative Fluid Management for Thoracic Surgery: the Puzzle of Postpneumonectomy Pulmonary Edema. *J Cardiothorac Vasc Anest.* 1995;9:442-51.
- ³¹ Verheijen-Breemhaar L, Bogaard JM, van den Berg B, Hilvering C. Postpneumonectomy Pulmonary Oedema. *Thorax.* 1988;43:323-26.
- ³² Chao DC, Scheinhorn DJ. Barotrauma vs volutrauma. *Chest.* 1996;109(4):1127-8.
- ³³ Alvarez JM, Tan J, Kejriwal N, Ghanim K, Newman MA, Segal A, Sterret G, Bulsara MK. Idiopathic postpneumonectomy pulmonary edema: hyperinflation of the remaining lung is a potential etiologic factor, but the condition can be averted by balanced pleural drainage. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2007;133:1439-47.
- ³⁴ Reed CE, Spinale FG, Crawford FA. Effect of Pulmonary Resection on Right Ventricular Function. *Ann Thorac Surg.* 1992;53:578-82.
- ³⁵ Okada M, Ota T, Okada M, Matsuda H, Okada K, Ishii N. Right Ventricular Dysfunction After Major Pulmonary Resection. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1994;108:503-11.
-
-

-
-
- ³⁶ Wittnich C, Trudel J, Zidulka A, Chiu RCJ. Misleading "Pulmonary Wedge Pressure" after Pneumonectomy: It's Importance in Postoperative Fluid Therapy. *Ann Thorac Surg.* 1986;42:192-6.
- ³⁷ Mathru M, Blakeman B, Dries DJ, Kleinman B, Kumar P. Permeability Pulmonary Edema Following Lung Resection. *Chest.* 1990;98:1216-18.
- ³⁸ Fein A, Grossman RF, Jones JG, Overland E, Pitts L, Murray JF, Staub NC. The Value of Edema Fluid Protein Measurement in Patients with Pulmonary Edema. *Am J Med.* 1979;67:32-8.
- ³⁹ Waller DA, Keavey P, Woodfine L, Dark JH. Pulmonary Endothelial Permeability Changes After Major Lung Resection. *Ann Thorac Surg.* 1996;61:1435-40.
- ⁴⁰ West JB, Mathieu-Costello O. Stress Failure of Pulmonary Capillaries: Role in Lung and Heart Disease. *Lancet.* 1992;340:762-7
- ⁴¹ Miserocchi G, Negrini D, Passi A, De Luca G. Development of Lung Edema: Interstitial Fluid Dynamics and Molecular Structure. *News Physiol Sci.* 2001;16:66-71.
- ⁴² Lases EC, Duurkens VAM, Gerritsen WBM, Haas FJLM. Oxidative Stress After Lung Resection Therapy: A Pilot Study. *Chest.* 2000;117:999-1003.
- ⁴³ Williams EA, Quinlan GJ, Goldstraw P, Gothard JW, Evans TW. Postoperative lung injury and oxidative damage in patients undergoing pulmonary resection. *Eur Respir J.* 1998;11:1028-34.
- ⁴⁴ Jordan S, Mitchell JA, Quinlan GJ, Goldstraw P, Evans TW. The pathogenesis of lung injury following pulmonary resection. *Eur Respir J.* 2000;15:790-9.
-
-

-
-
- ⁴⁵ Moncada S, Higgs A. The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. *N Engl J Med*. 1993;329:2002-12.
- ⁴⁶ Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol*. 2006;147(Suppl 1):193-201.
- ⁴⁷ Lu YT, Shu FL, Mitchell JA, Malik AB, Hellewell PG, Evans TW. The Role of Endogenous Nitric Oxide in Modulating Ischemia-Reperfusion Injury in the Isolated, Blood-perfused Rat Lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998;157(1):273-279.
- ⁴⁸ Prado CM. Efeitos do óxido nítrico e das fibras nervosas sensitivas sensíveis à capsaicina na modulação da inflamação crônica de vias aéreas em cobaias [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004.
- ⁴⁹ Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins MA, Tibério IF. Effects of Nitric Oxide Synthases in Chronic Allergic Airway Inflammation and Remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;35(4):457-65.
- ⁵⁰ Brown LM, Rannels SR, Rannels DE. Implications of Post-Pneumonectomy Compensatory Lung Growth in Pulmonary Physiology and Disease. *Respir Res*. 2001;2:340-7.
- ⁵¹ Lee E, Little AG, Hsu WH, Skinner DB. Effect of Pneumonectomy on Extravascular Lung Water in Dogs. *J Surg Res*. 1985;38:568-73.
- ⁵² Williams EA, Quinlan GJ, Anning PB, Goldstraw P, Evans TW. Lung Injury Following Pulmonary Resection in the Isolated, Blood-Perfused Rat Lung. *Eur Respir J*. 1999;14:745-50.
-
-

-
-
- ⁵³ Sakuma T, Sagawa M, Hida M, Nambu Y, Osanai K, Toga H et al. Time-Dependent Effect of Pneumonectomy on Alveolar Epithelial Fluid Clearance in Rat Lungs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2002;124:668-74.
- ⁵⁴ Noda M, Suzuki S, Tsubochi H, Sugita M, Maeda S, Kobayashi S, Kubo H, Kondo T. Single Dexamethasone Injection Increases Alveolar Fluid Clearance in Adult Rats. *Crit Care Med.* 2003;31:1183-9.
- ⁵⁵ Seidel AC, Fagundes DJ, Bazotte RB, Novo NF, Juliano Y, Meister H. Effect of Lung Resection and Sham Surgery on the Frequency of Infection in Alloxan-Diabetic Rats. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36:287-90.
- ⁵⁶ Seidel AC, Fagundes DJ, Novo NF, Juliano Y, Meister H, Bazotte RB. Response of the Lung after Pneumonectomy in Alloxan Diabetic Rats. *Braz Arch Biol Technol.* 2003;46:211-4.
- ⁵⁷ Bernardo WM. Modelo Experimental de Isquemia Pulmonar nas Fases Aguda e Crônica: Análise da Remodelação Vascular [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2003.
- ⁵⁸ Drake RE, Laine GA, Allen SJ, Katz J, Gabel JC. A model of the lung interstitial-lymphatic system. *Microvasc Res.* 1987;34(1):96-107.
- ⁵⁹ Monteiro R, Jatene FB, Pazetti R, Correia AT, Manoel LA, Bernardo WM et al . Evaluation of the cardiac morphological alterations secondary to the pulmonary emphysema: experimental study in rats. *Braz J Cardiovasc Surg.* 2004;19(4):341-7.
- ⁶⁰ Flo C, Lopes FD, Kasahara DI, Silva AC, Jesus RC, Rivero DH, Saldiva PH, Martins MA, Jacob-Filho W. Effects of exercise training on papain-
-
-

-
-
- induced pulmonary emphysema in Wistar rats. *J Appl Physiol.* 2006;100(1):281-5.
- ⁶¹ Batalha JRF, Saldiva PHN, Clarke RW, Coull BA, Stearns RC, Lawrence J, Murthy G GK, Koutrakis P, Godleski JJ. Concentrated Ambient Air Particles Induce Vasoconstriction of Small Pulmonary Arteries in Rats. *Environ Health Perspect.* 2002;110:1191-7.
- ⁶² Mountain CF. Revisions in the International System for Staging Lung Cancer. *Chest.* 1997;111:1710-7.
- ⁶³ Okada M, Nishio W, Sakamoto T, Uchino K, Yuki T, Nakagawa A, Tsubota N. Effect of Tumor Size on Prognosis in Patients with Non-Small Lung Cancer: The Role of Segmentectomy as a Type of Lesser Resection. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2005;129:87-93.
- ⁶⁴ Smythe WR. Treatment of Stage I Non-small Cell Lung Carcinoma. *Chest.* 2003;123(Suppl 1):181-187.
- ⁶⁵ Memtsoudis SG, Besculides MC, Zellos L, Patil N, Rogers SO, Selwyn O. Trends in Lung Surgery: United States 1988 to 2002. *Chest.* 2006;130(5):1462-70.
- ⁶⁶ Baumgartner F, Omari B, Lee J, Bleiweis M, Snyder R, Robertson J, Sheppard B, Milliken J. Survival after trauma pneumonectomy: the pathophysiologic balance of shock resuscitation with right heart failure. *Am Surg.* 1996;62(11):967-72. [Abstract, MEDLINE 1996].
- ⁶⁷ Watanabe S, Asamura H, Suzuki K, Tsuchiya R. Recent results of postoperative mortality for surgical resections in lung cancer. *Ann Thorac Surg.* 2004;78(3):999-1002.
-
-

-
-
- ⁶⁸ Fernández-Pérez ER, Keegan MT, Brown DR, Hubmayr RD, Gajic O. Intraoperative Tidal Volume as a Risk Factor for Respiratory Failure after Pneumonectomy. *Anesthesiology*. 2006;105:14-8.
- ⁶⁹ Max M, Nowak B, Dembinski R, Schulz G, Kuhlen R, Buell U, Rossaint R. Changes in Pulmonary Blood Flow during Gaseous and Partial Liquid Ventilation in Experimental Acute Lung Injury. *Anesthesiology*. 2000;93:1437-45.
- ⁷⁰ Rotta AT, Gunnarsson B, Hernan LJ, Fuhrman BP, Steinhorn DM. *J Crit Care*. 1999;14:84-92.
- ⁷¹ Simons RK, Maier RV, Chi EY. Pulmonary Effects of Continuous Endotoxin Infusion in the Rat. *Circ Shock*. 1991;33:233-43. [Abstract, MEDLINE 1991].
- ⁷² van Helden HP, Kuijpers WC, Steenvoorden D, Go C, Bruijnzeel PL, van Eijk M, Haagsman HP. Intratracheal Aerosolization of Endotoxin (LPS) in the Rat: a Comprehensive Animal Model to Study Adult (Acute) Respiratory Distress Syndrome. *Exp Lung Res*. 1997;23:297-316. [Abstract, MEDLINE 1997].
- ⁷³ Rothschild AM, Cordeiro RSB, Castania A. Acute Pulmonary Edema and Plasma Kininogen Consumption in the Adrenalin-Treated Rat: Inhibition by Acetylsalicylic Acid and Resistance to Salicylate and Indomethacin. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1975;288(2-3):319-21.
- ⁷⁴ Pabst R. The periarterial space in the lung: its important role in lung edema, transplantation, and microbial or allergic inflammation. *Pathobiology*. 2004;71:287-94.
-
-

-
-
- ⁷⁵ Pabst R, Tschernig T. Perivascular capillaries in the lung: an important but neglected vascular bed in immune reactions? *J Allergy Clin Immunol.* 2002;110(2):209-14.
- ⁷⁶ Schmiedl A, Tschering T, Luhrmann A, Pabst R. Leukocyte infiltration of the periarterial space of the lung after allergen provocation in a rat asthma model. *Pathobiology* 2005;72:308-15.
- ⁷⁷ Collins T. Inflamação Aguda e Crônica. In: Robbins SL et al. *Patologia Estrutural e Funcional*. 6^a Ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000, p.44-78.
- ⁷⁸ Kondo D, Imaizumi M, Abe T. Study on extravascular lung water and polymorphonuclear leukocyte elastase during acute phase following radical treatment of lung cancer: effect of ulinastatin on respiratory functions *Kyobu Geka*. 1993;46(11):922-5. [Abstract, MEDLINE 1993]
- ⁷⁹ Cerfolio RJ, Bryant AS, Thurber JS, Bass CS, Lell WA, Bartolucci AA. Intraoperative Solumedrol Helps Prevent Postpneumectomy Pulmonary Edema. *Ann Thorac Surg*. 2003;76:1029-35.
- ⁸⁰ Farley KS, Wang LF, Razavi HM, Law C, Rohan M, McCormack DG, Mehta S. Effects of macrophage inducible nitric oxide synthase in murine septic lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290(6):1164-72.
- ⁸¹ Ren D, Sun R, Wang S. Role of inducible nitric oxide synthase expressed by alveolar macrophages in high mobility group box 1--induced acute lung injury. *Inflamm Res*. 2006;55(5):207-15.
- ⁸² Prado CM, Leick-Maldonado EA, Yano L, Leme AS, Capelozzi VL, Martins
-
-

-
-
- MA, Tibério IF. Effects of Nitric Oxide Synthases in Chronic Allergic Airway Inflammation and Remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;35(4):457-65.
- ⁸³ Leuwerke SM, Kaza AK, Tribble CG, Kron IL, Laubach VE. Inhibition of compensatory lung growth in endothelial nitric oxide synthase-deficient mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2002;282(6):1272-8.
- ⁸⁴ Maxey TS, Fernandez LG, Reece TB, Keeling WB, Kron IL, Laubach VE. Endothelial Nitric Oxide Synthase is Essential for Postpneumectomy Compensatory Vasodilation. *Ann Thorac Surg*. 2006;81:1234-8.
- ⁸⁵ Hsia CC, Carlin JI, Cassidy SS, Ramanathan M, Johnson RL Jr. Hemodynamic changes after pneumectomy in the exercising foxhound. *J Appl Physiol*. 1990 Jul;69(1):51-7. [Abstract, MEDLINE 1990]
- ⁸⁶ Mathisen DJ, Kuo EY, Hahn C, Moncure AC, Wain JC, Grillo HC, Hurford WE, Wright CD. Inhaled Nitric Oxide for Adult Respiratory Syndrome after Pulmonary Resection. *Ann Thorac Surg*. 1998;66:1894-902.
- ⁸⁷ Rabkin DG, Sladen RN, DeMango A, Steinglass KM, Goldstein DJ. Nitric Oxide for the Treatment of Postpneumectomy Pulmonary Edema. *Ann Thorac Surg*. 2001;72:272-4.
- ⁸⁸ Filaire M, Fadel E, Decante B, Seccatore F, Mazmanian GM, Herve P. Inhaled nitric oxide does not prevent postpneumectomy pulmonary edema in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007;133(3):770-4.
-
-