

RODRIGO OLIVIO SABBION

**Influência da progressão da neoplasia pleural no resultado da
pleurodese em camundongos**

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

Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Mingarini Terra

SÃO PAULO

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sabbion, Rodrigo Olivio
Influência da progressão da neoplasia pleural no
resultado da pleurodese em camundongos / Rodrigo
Olivio Sabbion. -- São Paulo, 2019.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Cirurgia Torácica e Cardiovascular.
Orientador: Ricardo Mingarini Terra.

Descritores: 1.Derrame pleural 2.Neoplasias
pulmonares 3.Metástase neoplásica 4.Pleurodese
5.Talco

USP/FM/DBD-220/19

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Dedicatória

Dedico esta tese a minha família

Ao meu pai José Aparecido Sabbion, por me mostrar a honestidade e o amor para com todos; me ensinar como ter princípios justos e caráter forte. Homem e Médico que com sua simplicidade, se fez de espelho para minha vida profissional e exemplo a ser seguido até o fim da minha vida.

A minha mãe Sueli Bernadete Motta Sabbion, mulher forte, com incomparável amor e dedicação aos filhos. Minha primeira professora, que me ensinou as minhas primeiras palavras e assim, abriu todas as possibilidades para que eu pudesse viver este momento.

A minha irmã Bianca de Cassia Sabbion, mais jovem que eu, médica humana, exemplo de equilíbrio. Obrigado pelo apoio, amizade e principalmente união, que nos tem permitido caminhar juntos e vencer os obstáculos da vida.

Agradecimentos

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao Prof. Dr. Ricardo Mingarini Terra, chefe e educador, sempre em busca da excelência na arte de curar e na veracidade da pesquisa. Muito obrigado pela dedicação, respeito e inúmeras oportunidades de crescimento oferecidas a mim. Agradeço imensamente por tudo, e com certeza, por mudar o histórico da minha vida profissional.

A Prof Dra Lisete Ribeiro Teixeira que com todo seu conhecimento, dedicação e paixão pelo ensino, participou de cada etapa deste projeto. Meus profundos agradecimentos por toda a ajuda e ensinamentos na área da pesquisa e de me acolher com sua amizade em todos os momentos dessa caminhada.

Ao Prof. Dr. Paulo Cardoso, por sua gentileza e pela imensa colaboração em meu projeto, pelos inúmeros ensinamentos e melhorias sugeridas. Sem sombra de dúvidas, devido sua paixão pelo ensino e pesquisa, fez a diferença fundamental na confecção final desta tese.

AGRADECIMENTOS

Ao Sr. José Abdo Sader – “Zuza” (in memoriam), homem justo e de coração gigante. Educador apaixonado, que com sua amizade a frente do nosso tempo, é um dos responsáveis e incentivadores da minha jornada profissional.

Ao Prof. Dr. Marcos Naoyuki Samano e ao Prof. Dr. Jefferson Luiz Gross, por terem feito parte da minha banca de qualificação e fazerem comentários e sugestões pertinentes para o enriquecimento deste estudo.

A Marcia Augusto e Priscila Berenice por todo o constante incentivo e colaboração fundamental nesse projeto. Serei sempre e extremamente grato pela nossa parceria, que se tornou amizade durante toda essa caminhada.

A Dra. Milena Acencio, Vanessa e Carlos da Silva. Muito obrigado pela vossa colaboração essencial a este estudo; pelas horas de trabalho e ensino que me proporcionaram.

Ao Prof. Dr. Eduardo de Campos Werebe, pelo incentivo e companheirismo durante toda a caminhada. Muito obrigado pelas oportunidades e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Paulo Manuel Pego Fernandes, Professor Titular da Disciplina de Cirurgia Torácica do Instituto do Coração-HC-FMUSP, por me oferecer a estrutura necessária e a oportunidade para meu crescimento profissional e científico.

Normatização Adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento de sua publicação:

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

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão 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 F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

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

Sumário

Lista de abreviaturas e siglas**Lista de figuras****Lista de tabelas****Lista de gráficos****Resumo****Abstract**

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVO.....	5
2.1	Objetivo Primário.....	6
2.2	Objetivo Secundário.....	6
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3.1	Alternativas terapêuticas.....	8
3.2	A Pleurodese.....	8
3.3	Agentes esclerosantes.....	9
3.4	Fisiopatologia da pleurodese.....	10
3.5	Principais citocinas inflamatórias envolvidas na pleurodese.....	11
3.6	A resposta sistêmica.....	16
3.7	O talco.....	16
3.7.1	A segurança do talco.....	17
4	MÉTODOS.....	19
4.1	Modelos experimentais descritos.....	20
4.2	Modelo experimental utilizado.....	22
4.3	Grupos experimentais.....	24
4.4	Descrição dos Procedimentos.....	27
4.5	Avaliações.....	30
4.6	Coleta dos dados e análises de acordo com os períodos.....	31
4.6.1	Período inflamatório.....	31
4.6.2	Período fibrótico.....	32
4.6.3	Resposta sistêmica.....	35
4.7	Análise estatística.....	35
4.7.1	Estatística descritiva.....	35
4.7.2	Estatística inferencial.....	36
5	RESULTADOS.....	37
5.1	Resultados do Período Inflamatório.....	38
5.1.1	DHL líquido.....	38

5.1.2	IL6 do líquido pleural.....	39
5.1.3	VEGF do líquido pleural.....	40
5.1.4	Citologia do líquido pleural.....	41
5.1.5	Volume do líquido pleural (após 24hs de pleurodese).....	43
5.2	Resultados do Período Fibrótico.....	44
5.2.1	Escore de fibrose.....	44
5.2.2	Escore de inflamação pleural.....	45
5.2.3	Escore de aderência.....	46
5.2.4	Volume do líquido pleural (global)	47
5.2.5	Quantidade de Colágeno.....	48
5.3	Resultados da Resposta Sistêmica.....	49
5.3.1	Hemograma.....	49
5.3.2	Desidrogenase láctica sérica.....	51
5.3.3	Interleucina-6 sérica.....	52
5.3.4	Distribuição sistêmica do talco.....	53
6	DISCUSSÃO.....	56
7	CONCLUSÕES.....	64
8	ANEXOS.....	66
9	REFERÊNCIAS	78

		Pág.
Figura 1.	Pleura do camundongo com 3 dias de doença. Notamos a presença de poucas células neoplásicas aderidas na pleura visceral.	23
Figura 2.	Pleura do camundongo com 7 dias de doença. Notamos a presença de conglomerado de células neoplásicas aderidas na pleura visceral.	23
Figura3.	Algoritmo da subdivisão dos grupos, tempos e análises realizadas no estudo	25
Figura 4.	Demonstração da anestesia intraperitoneal no camundongo	27
Figura 5.	Esquema de injeção intrapleural nos camundongos	28
Figura 6.	Esquema de pleurodese com talco no camundongo	28
Figura 7.	Foto de corte histológico da pleura de camundongo submetido pleurodese, demonstrando talco em meio a doença pleural	52
Figura 8.	Foto de corte histológico do baço de camundongo submetido pleurodese, demonstrando partícula de talco no parênquima	53
Figura 9.	Foto de corte histológico do fígado de camundongo submetido pleurodese, demonstrando partículas de talco no parênquima	53
Figura 10.	Foto de corte histológico do coração de camundongo submetido pleurodese, demonstrando partículas de talco no parênquima	54

Tabela 2.	Escores macroscopicos de acordo com a tabela	33
Tabela 1.	Escore semi quantitativo de inflamação (0-4).....	34

	Pág.
Gráfico 1. Comparação da variação do DHL no líquido pleural entre os grupos de pleurodese precoce e tardia e entre os grupos câncer e controle.....	38
Gráfico 2. Comparação da variação da IL-6 no líquido pleural entre os grupos de pleurodese precoce e tardia e entre os grupos câncer e controle.....	39
Gráfico 3. Comparação da variação do VEGF no líquido pleural entre os grupos de pleurodese precoce e tardia e entre os grupos câncer e controle.....	40
Gráfico 4. Comparação do total de neutrófilos do líquido pleural entre os grupos de pleurodese precoce e tardia e entre os grupos câncer e controle.....	42
Gráfico 5. Comparação do volume do líquido pleural entre a pleurodese precoce e tardia e entre os grupos câncer e controle.....	43
Gráfico 6. Comparação da variação da fibrose entre a pleurodese precoce e tardia e entre os grupos câncer e salina.....	44
Gráfico 7. Comparação da variação da inflamação pleural entre a pleurodese precoce e tardia e entre os grupos câncer e salina).....	45
Gráfico 8. Comparação da variação das aderências pleurais entre a pleurodese precoce e tardia e entre os grupos câncer e salina).....	46
Gráfico 9. Comparação da variação do volume do líquido pleural entre a pleurodese precoce e tardia e entre os grupos câncer e controle	48
Gráfico 10 Comparação da variação da quantidade de colágeno Tipo I entre a pleurodese precoce e tardia e entre os grupos câncer e controle.....	49
Gráfico 11 Comparação da variação dos segmentados entre a pleurodese precoce (e pleurodese tardia e entre os grupos câncer e salina	51
Gráfico 12 Comparação da desidrogenase láctica sérica entre a pleurodese precoce e pleurodese tardia e entre os grupos câncer e salina.....	52

Sabbion RO. ***Influência da progressão da neoplasia pleural no resultado da pleurodese em camundongos*** [tese]. “São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2019.

INTRODUÇÃO: Trata-se de estudo experimental com a finalidade de avaliar se o tempo de evolução de doença neoplásica pleural está associado ao grau de fibrose pleural na pleurodese com talco, descrever alterações nos níveis pleurais de mediadores inflamatórios ativados pela pleurodese em diferentes tempos de evolução da doença neoplásica pleural e analisar se o tempo de evolução da doença neoplásica pleural é o fator que influencia na segurança da pleurodese com talco em camundongos. **MÉTODOS:** Noventa e dois camundongos foram randomizados em 2 grupos Câncer(injetados com 50mil células de lewis intrapleural) e Salina(injetados com 0,5ml de soro fisiológico intrapleural), os quais foram subdivididos em Grupos Precoces(submetidos a pleurodese após 3 dias da injeção pleural) e Grupos tardios(submetidos a pleurodese após 7 dias de injeção pleural), compondo 4 grupos de estudo. Parte dos animais foram sacrificados após 24hs da pleurodese (para obtermos os dados inflamatórios) e outra parte após 8 dias (para obtermos os índices macro e microscópico de fibrose pleural). **RESULTADOS:** Os Grupos Câncer tiveram escores menores de fibrose que os grupos salina, e essa diferença se intensificou quando comparadas as fases precoces com as fases tardias ($p<0,001$). (Gráfico 6). Os escores de inflamação foram menores nos grupo Câncer, particularmente no grupo Câncer tardio($p<0,001$). Nos grupos Salina a inflamação foi intensa em 100% dos animais nos dois subgrupos(precoces e tardio)($p<0,001$). (Gráfico 7). As aderências não tiveram diferenças estatísticas nas fases precoces. Nos grupos tardios, o subgrupo Câncer tardio teve os escores mais baixos, e encontramos fibrose intensa somente no subgrupos Salina tardio($p<0,001$). (Gráfico 8). As análises dos marcadores inflamatórios pleurais mostraram resultados de variabilidade muito alta, não sendo possível identificação de diferenças significativas, a exceção do VEGF, que foi aumentado nos animais com câncer particularmente nos animais do subgrupo Câncer tardio($p=0,007$), assim como o DHL sistêmico($p<0,001$). O grupo câncer tardio foi o único grupo onde ocorreu distribuição sistêmica do talco. (fig.

7). **CONCLUSÃO:** O tempo de evolução da neoplasia pleural é inversamente proporcional ao grau de fibrose pleural em camundongos submetidos a pleurodese com talco. Quanto mais precoce a pleurodese, melhores os resultados relacionados a fibrose, menor inflamação sistêmica, a circulação do talco é menor e conseqüentemente, maior a segurança da pleurodese.

Descritores: Derrame pleural, Neoplasias pulmonares, Metástase neoplásica, Pleurodese, Talco

Abstract

Sabbion RO. ***Influence of the progression of pleural neoplasia on the outcome of pleurodesis in mice (thesis)***. "São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2019.

PURPOSE: This is an experimental study aimed at evaluating whether the time course of pleural neoplastic disease is associated with the degree of pleural fibrosis in pleurodesis with talc slurry, describing changes in pleural levels of inflammatory mediators activated by pleurodesis at different times of the pleural neoplastic disease and determining whether the time course of neoplastic pleural disease is the factor that influences the safety of talc pleurodesis in mice. **METHODS:** Ninety-two mice were randomized in 2 groups with 50 mice each. Cancer group that received intrapleural injection of Lewis cells) and Salina group that received intrapleural injection of 0.5ml of saline solution. Both groups were subdivided into Early Groups (submitted to pleurodesis after 3 days of pleural injection) and Late Groups (submitted to pleurodesis after 7 days of pleural injection). Half of the animals in each group was sacrificed after 24 hours of pleurodesis (to obtain the inflammatory data) and another part after 8 days (to obtain the macro and microscopic indices of pleural fibrosis). **RESULTS:** Cancer Groups had lower fibrosis scores than Salina groups and this difference was more evident when comparing the early phases with the late phases ($p < 0.001$). Inflammation scores were lower in Cancer groups, particularly in the Late group ($p < 0.001$). In Salina groups the inflammation was intense in 100% of the animals in the two subgroups (early and late) ($p < 0.001$). Pleural adhesions did not show statistical differences in the early stages. In the late groups Cancer group had the lowest scores, and we found intense fibrosis only in the Saline groups ($p < 0.001$). The analysis of the pleural inflammatory markers showed high variability results and it was not possible to identify significant differences among groups. The exception was the level of , VEGF ($p = 0.007$) and LDH ($p < 0.001$) which were increased in animals with cancer particularly in Late Cancer subgroup. Systemic distribution of talc occurred only in the Late Cancer group. **CONCLUSION:** The time of evolution of pleural neoplasia is inversely proportional to the degree of pleural fibrosis in mice submitted to talc slurry pleurodesis. The earlier pleurodesis showed the best results related to fibrosis, with less systemic inflammation and lower systemic circulation of talc ; consequently, the pleurodesis is better and safe. .

Descriptors: Pleural effusion, Lung neoplasia, Pleurodesis, Metastasis, Talc

1 Introdução

O derrame pleural é definido como acúmulo de líquido entre os folhetos pleurais que recobrem a cavidade torácica e pulmões. É uma entidade clínica frequente, para a qual são descritas mais de cinquenta etiologias e diversos tipos de apresentação na prática médica. Por ter tantas nuances necessita, portanto, de diferentes tipos de abordagens e tratamentos. Quando há a presença de células neoplásicas neste líquido ou biópsia pleural com diagnóstico de acometimento por câncer, o derrame pleural passa a ser definido como derrame pleural maligno.

Dentre todas as causas conhecidas, o derrame pleural neoplásico é o tipo de derrame que vem ganhando destaque devido ao aumento de sua incidência. Isso ocorreu devido à melhora nos padrões de tratamento clínico relacionados ao câncer e, conseqüentemente, ao surgimento de maior quantidade de complicações relacionadas a esse tipo de doença.

Estatísticas norte-americanas antigas já apresentavam o significativo número de mais de 1.000.000 casos novos de derrame pleural/ano, e destes, cerca de 200.000 estavam associados à doença maligna¹. Mesmo com estes índices já elevados, expectativa é de um aumento de 5% ao ano nestes dados².

O mecanismo do comprometimento pleural metastático mais frequente é a disseminação vascular das células tumorais de órgãos distantes para o pulmão e para a pleura visceral, com implantes secundários na pleura parietal. A pleura visceral apresenta-se acometida em 87% dos casos de metástases, enquanto que, na pleura parietal, as metástases estão presentes em 47% dos casos avaliados por necropsia³.

Outros mecanismos de acometimento pleural possíveis são a invasão direta da parede torácica (em câncer de origem pulmonar primária, de parede torácica e carcinoma de mama), a disseminação hematogênica diretamente para a pleura parietal e o envolvimento linfático. Além disto, o aumento da permeabilidade capilar por resposta inflamatória e a interferência com a integridade da drenagem linfática por comprometimento neoplásico

mediastinal podem contribuir para o acúmulo anormal de líquido no espaço pleural⁴.

Além de estar associado à redução da expectativa de vida dos pacientes devido à disseminação da doença,⁵ o acúmulo progressivo de líquido na cavidade pleural causa diversas alterações na mecânica ventilatória (compressão passiva do parênquima pulmonar, rebaixamento do diafragma e balanço contralateral do mediastino) resultando em dispneia e comprometendo a qualidade de vida destes pacientes.⁶

A pleurodese surge nesse contexto com a finalidade de impedir o acúmulo de líquido no tórax e melhorar a qualidade de vida desta população, melhorando os sintomas relacionados ao derrame e trazendo mais conforto. Entretanto, há grande controvérsia entre cirurgiões torácicos e oncologistas em relação ao momento ideal para realizar a pleurodese. Por um lado, os cirurgiões defendem que a pleurodese seja realizada precocemente pelo fato de que seria mais eficiente e mais resolutiva, com boa relação risco benefício ao paciente. Por outro lado, os oncologistas defendem que com o tratamento quimioterápico o líquido em excesso pode ser controlado, evitando-se procedimentos mais invasivos. Ambos tem seus argumentos válidos e a literatura ainda não apoia mais definitivamente nenhuma das duas tendências.

E, mesmo com os estudos realizados até o momento descrevendo os mecanismos inflamatórios envolvidos na pleurodese e fibrose pleural associada, não temos respostas a estas perguntas.

O que sabemos até o momento é que a célula mesotelial exposta ao talco é ponto fundamental no processo de pleurodese, pois participa da liberação de diversos mediadores. Um dos principais é a interleucina-6, que media a liberação do fator de crescimento Beta (TGF- β) e o VEGF. Assim, quando a população de células mesoteliais se reduz devido a comprometimento tumoral, a resposta ao agente esclerosante é diminuída, podendo culminar com a falha da pleurodese⁷.

Os estudos que correlacionaram o grau de acometimento pleural e a efetividade da pleurodese sugerem que existe correlação negativa entre as duas variáveis⁸; entretanto o grau de acometimento pleural, por si só, não

seria responsável pelo sucesso ou não da pleurodese com talco. Estes estudos questionam o papel de outros mecanismos biológicos envolvidos na falha do procedimento particularmente aqueles relacionados à ativação da cascata inflamatória intrapleural, refletida por variações nos níveis de TGFB, IL6 e VEGF.⁸

No contexto exposto acima, associado ao grande número de novos casos de câncer e conseqüentemente de derrame pleural neoplásico, o interesse pela literatura atual a respeito do tema cresceu proporcionalmente. Mesmo com a atenção maior dada pela comunidade científica, ainda sabemos pouco sobre o mecanismo de formação do líquido pleural e fibrose em seu ajuste fino, e nada foi publicado correlacionando essas questões ao grau de acometimento neoplásico da pleura. Decidimos, portanto dar nosso primeiro passo na tentativa de resposta para algumas questões.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Primário

O Objetivo principal deste estudo é avaliar se o tempo de evolução de doença neoplásica pleural está associado com o grau de fibrose pleural em camundongos submetidos à pleurodese com talco

2.2 Objetivo Secundário

Os objetivos secundários deste estudo são:

- Descrever as alterações nos níveis pleurais de mediadores inflamatórios ativados pela pleurodese em diferentes tempos de evolução da doença neoplásica pleural.
- Analisar se o tempo de evolução da doença neoplásica pleural é o fator que influencia na segurança da pleurodese com talco em camundongos.

3 Revisão da Literatura

3.1 Alternativas terapêuticas

A abordagem cirúrgica da cavidade pleural é necessária como terapia primária ou complementar para o tratamento do derrame pleural. Esta pode ser realizada através de procedimentos menos invasivos como uma simples drenagem fechada (seja com cateteres provisórios ou drenagem intermitente permanente, a depender da indicação) até intervenções maiores como videotoroscopia, decorticação ou pleurodese.

A pleurodese surge neste cenário como alternativa para erradicar a formação do excesso de líquido pleural, pela instilação de agente esclerosante na cavidade torácica. A presença deste agente ativa a cascata inflamatória e de coagulação, produzindo fibrina e consequentemente fibrose. O produto final das cascatas (fibrose) é o responsável pela formação de aderências e sínfise entre os folhetos pleurais.⁹

Os primeiros relatos de pleurodese datam do início do século XX, quando Bethune injetou talco no espaço pleural, com o objetivo de colabar uma cavidade pós lobectomia⁹. Atualmente, é utilizada no tratamento de processos pleurais recidivantes de diferentes etiologias, sendo empregada principalmente no tratamento de derrames pleurais neoplásicos.

3.2 A Pleurodese

Para a indicação da pleurodese em derrames pleurais neoplásicos, o paciente deve preencher obrigatoriamente os seguintes critérios de eleição⁹.

- Ter derrame pleural recidivante com presença de células neoplásicas,
- Ter Performance Status maior que 40,

- Apresentar melhora dos sintomas e expansão pulmonar na radiografia de tórax após a retirada do líquido

Nestes pacientes, pleurodese torna-se o procedimento de escolha, com a finalidade de erradicar o líquido, melhorar a função ventilatória, e consequentemente, a qualidade de vida dos pacientes.

3.3 Agentes esclerosantes

Na teoria, o agente esclerosante ideal teria as seguintes características:

1. Custo reduzido;
2. Ampla distribuição mundial;
3. Facilidade no manejo, administração e esterilização;
4. Baixos índices de infecção pleural;
5. Prescindir do esvaziamento da cavidade;
6. Não provocar, de forma intensa, dor ou desconforto;
7. Mortalidade nula e morbidade mínima;
8. Eficácia próxima a 100%.

Definido o ideal (que até o momento não foi descoberto), vários estudos foram publicados e muitas discussões foram pautadas sobre qual seria o melhor agente esclerosante para a pleurodese. Foram descritos desde radioisótopos, quimioterápicos (mostarda nitrogenada, bleomicina, mitoxantrona), derivados da tetraciclina (doxiciclina e minociclina), talco, eritromicina, nitrato de prata, iodo iodopovidona, *Corynebacterium parvum* até o OK-432, que é um imunoestimulante obtido a partir do *Streptococcus pyogenes*¹⁰.

Todos estes agentes são subdivididos de acordo com a forma de ação para resultar em fibrose: estímulo mecânico, como a abrasão da pleura, estímulos químicos (que descamam o mesotélio) e estímulo imunológico.

Após comparar as opções e atentos nas características do que seria um agente ideal, o preferido atualmente é o talco. Ele produz o estímulo químico aliado ao

mecânico, e dentre suas outras características, destaca-se das demais opções por ser eficaz, barato e relativamente seguro (conforme descreveremos adiante).

3.4 Fisiopatologia da pleurodese

O processo inflamatório pleural induzido pela pleurodese não está completamente elucidado e é dependente do agente esclerosante escolhido¹¹. Sabemos que na fase precoce da pleurodese induzida por talco ou nitrato de prata, ocorre lesão mecânica da camada mesotelial. Essa escarificação celular libera citocinas que faz com que ocorra inflamação aguda pleural e sistêmica, além do recrutamento de neutrófilos. As principais citocinas descritas nesse processo são a IL-6 e VEGF¹² dentre outras.

A IL-6 age estimulando células T, diferenciando células B e favorecendo tanto a hematopoese quanto a trombopoese¹³, recrutando células e favorecendo o acúmulo de líquido. Em conjunto com a IL-8(a qual não é possível mensurá-la em camundongos), são as responsáveis pela formação do líquido pleural^{14,15}

Este exsudato rico em proteínas é posteriormente reabsorvido, e são formadas as aderências, inicialmente compostas apenas de fibrina que funciona como um substrato para a intensa ativação de fibroblastos e formação de colágeno¹⁶.

Nesta fase, é importante ressaltar o papel do TGF- β , citocina multifuncional capaz de inibir certas respostas celulares, aumentar a proliferação de outras, controlar os múltiplos aspectos do tecido conectivo e influenciar numerosos pontos de controle do sistema imune¹⁷. É conhecida por estimular a fibronectina e a produção do colágeno, ao induzir nas células mesoteliais humanas a síntese de RNA mensageiro do colágeno tipo I¹⁸.

Tem um papel importante em muitas facetas das doenças pleurais, particularmente em relação a suas propriedades pró-fibróticas e anti-inflamatórias¹⁵.

Com a produção de colágeno pelos fibroblastos, mediada pelo TGF- β , as aderências vão se tornando mais espessas e estruturadas, acabando por obliterar o espaço entre a pleura visceral e parietal e impedindo assim a recidiva e reacúmulo do derrame pleural¹⁶.

3.5 Principais citocinas inflamatórias envolvidas na pleurodese

A) IL6

A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória, induzida com as citocinas fator- α de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina-1 (IL-1) em muitas condições de alarme, num sinergismo de ação inflamatória rotulado como *resposta de fase aguda*^{19,20}.

É produzida por vários tipos celulares imunologicamente ativos: linfócitos T e B, fibroblastos, macrófagos, células mesoteliais e endoteliais.

Devido ao seu papel nos processos inflamatórios, esta interleucina é considerada como marcadora de ativação sistêmica das citocinas pró-inflamatórias¹⁹, e pode inclusive, apresentar-se como marcador de mau prognóstico quando presente em algumas situações neoplásicas²¹.

Após procedimentos cirúrgicos, por exemplo, a concentração de IL-6 no soro eleva-se dentro de 2 a 4hs e a intensidade da resposta correlaciona-se com a duração da injúria. Por este motivo, pode ser um bom marcador de dano tissular e seus níveis um bom marcador de prognóstico, pois existe uma correlação comprovada entre suas concentrações e o grau de severidade do quadro clínico do paciente^{22,23}.

Na pleura, trabalhos pesquisando níveis de IL-6 correlacionadas com injúria pleural (videotoroscopia e pleurodese), mostraram que os níveis de IL-6 (em conjunto com MMP-9 e PCR), que estes marcadores sobem nas primeiras horas e culminam em 16 a 48hs após a intervenção, com níveis entre

1.5 inicialmente indo para 102 no caso da MMP-9, que se correlacionava significativamente com IL-6 ($r=79$, $n=47$, $p<0,1$)²⁴.

Também sabemos que, mesmo quando não ocorre injúria externa a pleura (cirurgias ou pleurodese, por exemplo), ao comparamos os níveis de IL-6 nos exsudatos e transudatos, existe grande diferença entre os dois grupos (3,350+-3,627 vs. 1,677+-1,086 pg/ml), tendo níveis muito maiores nos exsudatos, refletindo também a extensão do comprometimento pleural diretamente proporcional aos níveis encontrados²⁵.

Estes achados¹⁴ sugerem que os níveis de IL-6 no líquido são bem correlacionados com a inflamação pleural¹⁴, porém este fato não se repete no plasma, onde os níveis de IL-6 não se alteram tanto quando comparados com os níveis pleurais quando ocorre algum tipo de inflamação ou infecção na pleura²⁵.

Em relação à pesquisa experimental, Diao e Kohanawa já demonstraram que os níveis de IL-6 podem ser também usados, na diferenciação entre exsudatos e transudatos, inclusive em ratos, refletindo, de certa forma, a mesma fisiopatologia quando comparada as curvas em humanos²⁶.

Também no âmbito experimental, ²⁷ a IL-6 tem seus níveis elevados em lavados pleurais de cães submetidos à toracotomia para dissecação linfonodal, e seus níveis não tem diferença estatística entre os animais submetidos à toracotomia apenas e toracotomia com dissecação linfonodal²⁷.

Dessa forma, concluímos que a IL-6 é uma citocina muito bem estudada e reportada em estudos como indicador do status inflamatório em animais e seres humanos, tendo a mesma curva e modelo de ação em ambos. Isso justifica seu uso em estudos clínicos e experimentais, incluindo este²⁷.

B) VEGF

O VEGF é a única glicoproteína dimérica com massa molecular de 34-42kDa. É expressada por vários tipos celulares jovens, mas também é super expressada por inúmeras células neoplásicas de diversos tipos tumorais¹⁶.

Tem 2 propriedades principais: a capacidade de aumentar função angiogênica e intervir na função de defesa ao atuar sobre os linfócitos.

Em relação à ação com o sistema capilar, o VEGF além de estimular o crescimento dos capilares sanguíneos, também tem efeito mitogênico específico e efeitos quimiotáticos em células endoteliais vasculares¹⁵. Assim, além de aumentar a quantidade de capilares, também aumenta a sua permeabilidade, em um valor maior que 50mil vezes o da histamina^{16,28}. Devido a isso, é implicado na formação dos derrames, principalmente os neoplásicos (conforme medidas encontradas desta citocina quando comparadas ascite), liquor e outras efusões, em situações que envolviam células malignas e outras nas quais tais células não eram encontradas²⁰.

Como já sabemos, o VEGF está presente em derrames pleurais de várias etiologias²⁹, e seu papel na formação de derrames cavitários foi estudado por Yano e colaboradores³⁰. Foram injetadas células de adenocarcinoma e de carcinoma espinocelular em camundongos e observaram que os animais com adenocarcinoma expressaram níveis mais elevados de VEGF e tumores mais vascularizados quando comparados ao outro grupo. Além disso, os níveis de VEGF tiveram correlação direta com a quantidade de derrame maligno formado.

Em uma fase posterior, as células de adenocarcinoma foram transfectadas com um gene anti-VEGF165, que ao suprimir a produção de VEGF, reduziu significativamente a permeabilidade vascular e a quantidade de derrame pleural produzido. Achados semelhantes foram obtidos, em camundongos, após a instilação intraperitoneal de células de carcinoma ovariano e utilização concomitante de anticorpos neutralizantes anti-VEGF. Os autores observaram redução da massa tumoral, aumento da sobrevida dos

animais e inibição quase completa da produção de ascite neoplásica no grupo tratado³⁰.

Estudos também demonstraram que, geralmente, os exsudatos apresentam níveis de VEGF significativamente mais elevados do que os transudatos^{31,32}.

O VEGF está presente na formação dos derrames pleurais também por aumentar a permeabilidade da barreira mesotelial³³, e, potencializar a passagem pela parede de capilares e vênulas, através da abertura das junções intercelulares e da indução de fenestrações no endotélio, mesmo em regiões onde estas não costumam ocorrer³¹.

Em relação a seu efeito no sistema de defesa, o VEGF (assim como IL-10 e TGF- β) é detectado no microambiente neoplásico^{32,34} ambos atuando como obstáculo ao efeito imune antitumoral, e não ao crescimento do tumor em si^{35,36}. Por esse motivo, é relacionado ao pior prognóstico dos pacientes que demonstram maiores índices desta citocina^{37,38}.

Ao contrario da interleucina-8, descreve sua curva igualmente no sangue e liquido pleural, ou seja, logo após a pleurodese, o VEGF tende a aumentar seu valor paralelamente no liquido e no sangue, refletindo assim, aumento de permeabilidade capilar, contribuindo não só para o aumento do volume de liquido pleural mas, consequentemente contribuindo para o aumento da passagem de pequenas moléculas do espaço pleural para o sangue³⁹.

Não há estudos correlacionando os níveis de VEGF com o resultado final da pleurodese e segurança relacionado ao talco.

C) DHL

O DHL é uma enzima celular cujo nível se eleva como resultado de lesões teciduais de uma maneira inespecífica⁴⁰. Por isso, é elevado em várias condições clínicas⁴⁰.

No entanto, a DHL sérica alta desproporcionalmente e isolada é específica para certos grupos de diagnóstico como sepsis e câncer. Além disso, trata-se de um marcador de mau prognóstico nessas condições^{41, 42}.

A elevação do DHL pleural reflete o uso preferencial da glicólise em detrimento a fosforilação oxidativa pelas células tumorais. Isso seria vantajoso para o crescimento do tumor, pois por essa via, as células são capazes de produzir adenosina trifosfato(ATP) consideravelmente mais rápido que a fosforilação oxidativa⁴³.

A alta taxa de DHL reflete então na prática, um crescimento tumoral mais rápido e conseqüentemente, maior necrose tumoral na pleura e teoricamente maior agressividade, sendo usado como preditor de sobrevida em alguns trabalhos em populações asiáticas⁴¹.

Verma et. al⁴⁴, estudaram o desempenho do DHL pleural na predição de sobrevida de pacientes com Adenocarcinoma pulmonar e derrame pleural, através de coorte retrospectiva e concluíram que o valor do DHL encontrado no líquido pleural tinha correlação inversa: quanto maior o valor do DHL, menor a sobrevida. Em valores absolutos, pacientes com DHL pleural >1500UI/L tem sobrevida maior que um ano⁴⁵.

Dentro do mesmo prisma relacionado ao DHL pleural, alguns outros estudos (mesmo limitados por serem retrospectivos), julgam o DHL um melhor preditor de sobrevida que o ECOG⁴⁵. A justificativa seria de que o ECOG não é tão fidedigno, pois poderia ser influenciado pela idade do início da doença (um paciente mais jovem estaria melhor que um paciente idoso com o mesmo estágio da doença), tipo de neoplasia (câncer de pulmão seria mais debilitante que câncer de mama).

Dois grandes ensaios clínicos randomizados demonstraram que as estratégias de cálculo da expectativa de vida relacionada ao derrame pleural neoplásico não eram fidedignas. No trial TIME2, apesar de excluir os pacientes com sobrevida prevista de <3 meses, 34% morreram após 3 meses do início

do trial .Em outro estudo, 17% dos pacientes com sobrevida estimada em 2 meses, morreram em menos de 30 dias⁴⁶. Dessa forma, o julgamento clínico baseado unicamente na escala ECOG se baseia é imprecisa. O DHL pleural seria mais objetivo e preciso como preditor em pacientes com baixa sobrevida estimada⁴⁴.

3.6 A resposta sistêmica

As curvas de resposta das principais citocinas envolvidas (IL-6), hemograma e DHL já são bem conhecidas ao relacionarmos com resposta inflamatória sistêmica. No entanto, nada foi estudado até o momento correlacionando esses parâmetros com o grau de acometimento pleural por células neoplásicas.

Nada se sabe ainda sobre a relação entre o grau de acometimento neoplásico pleural com o aumento ou diminuição da inflamação e efetividade ou não da pleurodese com talco.

3.7 O talco

O talco é o agente esclerosante que mais se aproxima do agente esclerosante ideal, conforme descrito anteriormente, mas mesmo sendo o mais usado, ainda perduram dúvidas em relação ao seu uso e efeitos colaterais.

Os mecanismos inerentes aos efeitos sistêmicos após o uso de talco para pleurodese, como a síndrome da angústia respiratória (especialmente), ainda são desconhecidos.

As possíveis causas e, dentre elas, provavelmente a principal, incluem a migração das partículas de talco da cavidade pleural para a circulação sistêmica.

Isto ocorre por diversos motivos, e dentre eles podemos citar:

- Alterações provocadas pelos diferentes componentes do talco (incluindo a presença de agentes contaminantes);
- Estabelecimento do processo inflamatório na cavidade pleural, alterando a permeabilidade de capilares sanguíneos e linfáticos e
- Procedimentos cirúrgicos realizados (biópsias) que proporcionam uma via de acesso que facilite a absorção sistêmica^{29,31}.

3.7.1 A segurança do talco

A cadeia de eventos inflamatórios que levam à ocorrência de efeitos locais e sistêmicos é acionada pela resposta inflamatória mediada aos componentes de talco ou contaminantes, tanto no espaço pleural quanto fora dele.

A compreensão dessa resposta não só pleural, mas também sistêmica é de grande importância, principalmente no que diz respeito à resposta celular aguda por leucócitos, linfócitos, citocinas e secundariamente, o nível de DHL.

No líquido pleural, temos os mesmos parâmetros, exceto pelo fato de que a resposta celular aguda que ocorre na cavidade pleural é descrita primariamente pela desidrogenase láctica, a principal enzima que reflete essas manifestações, e secundariamente, contagem celular específica (ao contrário do que ocorre no sangue)³⁹.

Trabalhos relacionados ao tema segurança no uso versus resposta inflamatória sugerem que partículas menores são mais facilmente absorvidas pela circulação sistêmica, causando os efeitos adversos descritos^{47,48,49}.

Vários autores corroboram com esta teoria, desde o primeiro trabalho descrevendo a absorção sistêmica do talco publicado em 1999 por Werebe et

al.⁵⁰ utilizando partículas de 5,7 a 70um em ratos. Foram encontradas partículas de talco no cérebro, fígado, baço, coração e no pulmão contralateral.

Na mesma linha de pesquisa, surgiu em 2002, Ferrer et al.⁴⁹, com partículas de 8,3um, que demonstrou haver maior inflamação com partículas menores.

Por fim, Fraticelli et al., com partículas maiores (33um) e que aparentemente demonstrou menor disseminação, enquanto partículas <5um, causaram reação inflamatória pleural e sistêmica maior e mais prolongada⁵¹ de acordo com parâmetros inflamatórios medidos no líquido pleural e sangue, inclusive na proteína C reativa, quando comparado pleurodese com partículas <20um e <10um, sendo a PCR maior quando utilizadas partículas <10um⁵².

Mais atualmente, Froudarakis et al.⁵³ avaliou o efeito do talco na reação inflamatória sistêmica na pleurodese quando comparada somente a biópsia pleural. Neste estudo, o autor concluiu que o talco participa ativamente do sistema reacional, causando leucocitose (especialmente no que tange aos neutrófilos) e associado à febre. Paralelamente, a proteína C também era significativamente maior no pacientes submetidos à talcagem⁵³.

Não existem estudos correlacionando a absorção de talco com o grau de reação inflamatória nem tampouco ao grau de acometimento pleural por doença neoplásica.

4 Métodos

4.1 Modelos experimentais descritos

A fisiopatologia do derrame pleural neoplásico era pobremente compreendida até pouco tempo atrás devido à falta de modelos animais singênicos e imunocompetentes que expressassem relativa similaridade de respostas quando comparados aos seres humanos.

O modelo que mais se aproximou destes requisitos e possibilitou grande avanço na nossa área de pesquisa foi o desenvolvido pelo grupo de Stathopoulos GT e KalomenidisL utilizando camundongos C57 Black6 (C57/BL6), imunocompetentes, nos quais eram injetados com 100mil células singênicas de carcinoma pulmonar intrapleural, denominadas Células LLC (denominadas células LLC (*Lewis Lung Cancer*), provenientes do banco de células *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA)⁵⁵.

O tamanho do camundongo C57/BL6, a facilidade na reprodução da espécie, a viabilidade de análise de reagentes e ferramentas, e a multiplicidade genética (incluindo possibilidades para engenharia genética - Knockouts (genes deficitários específicos), Knocking (genes carreadores específicos) e camundongos transgênicos)⁵⁵ demonstraram ser melhores que os modelos prévios, como ratos (Balb/c) imunodeficientes injetados com células de fibrossarcoma (MethA), e coelhos (NZW-New Zealand White) injetados com células VX2⁵⁶.

Os camundongos C57/BL6 imunocompetentes e singênicos são superiores aos demais modelos de derrame neoplásico basicamente pelos motivos listados abaixo:

A reação inflamatória altera a progressão tumoral e a fisiopatologia da reação inflamatória do derrame pleural. Nos animais imunocomprometidos este fenômeno é muito menor, resultando em menor acúmulo de líquido e distanciamento do mimetismo em humanos. Dessa forma, o uso de imunocomprometidos poderia enviesar a resposta inflamatória pleural⁵⁷ principalmente quando medimos as citocinas pro inflamatórias produtoras de

derrame pleural, como TNF-A, NF-kB e a proteína quimioatrativa de monócitos (MCP-1), além de prejudicar a avaliação de toxicidade^{58,59}.

Em segundo lugar, a formação do derrame pleural é o resultado de complexas interações entre o tumor e hospedeiro (as células tumorais secretam mediadores que atraem células inflamatórias do hospedeiro, células endoteliais e aumentam a permeabilidade vascular), e por isso é importante os dois serem singênicos, para que possam utilizar a mesma linguagem “espécie-específica” e com isso, reproduzir com maior precisão a resposta humana^{60, 61}. Isto é válido desde quando se trata de citocinas como a IL6 e VEGF⁵⁷, além de abrir também a possibilidade de pesquisar mediadores seja do hospedeiro ou tumor, mesmo sendo de diferentes espécies⁵⁵.

Ao assumirmos portanto, que o melhor modelo de neoplasia seria o de Kalomenidis et. al, fomos em busca do modelo de pleurodese.

O pioneiro no desenvolvimento desse modelo, Marchi et.al⁶², também utilizou camundongos da espécie C57/BL6, que foram submetidos a pleurodese com talco (solução de soro fisiológico com concentração de 4mg/g de talco estéril).

Nesta concentração de talco, Marchi obteve pleurodese com sucesso após 28 dias, com escores de adesão macroscópica com valores de 3,6+-4 (em escala que variava de 0 a 4, sendo 3 a correspondente por ter aderências com fibrose em toda a pleura e 4 pleura com sínfise completa), e escore microscópico de inflamação ficou com média 1,9+-0,8 (em escala que variava 0 a 4, onde 1 era inflamação mínima e 2 inflamação moderada).

A dose de talco utilizada nos animais é muito maior proporcionalmente a utilizada em humanos (calculada em g/m²). Na prática, torna-se mais de 50 vezes proporcionalmente maior (0,07mg/g em humanos).

Mesmo com esta discrepância, o modelo de Marchi provou ser extremamente útil e factível por tratar-se de animal singênico e imunocompetente e assim, trazer todas as vantagens no manejo descritas anteriormente.

4.2 Modelo experimental utilizado

O estudo foi realizado no Laboratório de Pleura do Instituto do Coração (InCor), aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) número 178/14 do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), por um período de 5 meses.

Para o desenvolvimento deste estudo, utilizamos modelo animal de neoplasia pleural descrito por Statophoulos⁵⁴ e modificado de acordo com os estudos pilotos descritos nos anexos, descritos no Anexo 1, injetando 50mil células de Lewis intrapleurais para simular neoplasia.

O modelo de pleurodese utilizado foi o descrito por Marchi et. al⁶².

Utilizamos 92 camundongos C57BL/6.

Destes, 50 indivíduos foram injetados com 50mil células LLC (*Lewis Lung Cancer*), provenientes do banco de células *American Type Culture Collection* (ATCC, EUA), intrapleurais.

O grupo controle foi feito com outros 42 animais (8 dos 50 animais deste grupo morreram nos procedimentos), os quais foram submetidos a injeção de soro fisiológico 0,9% na cavidade torácica com a finalidade de violação pleural.

Para obtermos um grupo de animais com doença neoplásica pleural menos extensa e outro grupo com doença neoplásica pleural mais desenvolvida, utilizamos os tempos de 3 e 7 dias após a injeção intrapleurais de 50mil células de Lewis.

Esses tempos após a indução de doença neoplásica pleural foram escolhidos de acordo com os estudos piloto descritos nos anexos. Além de significar um período maior que o dobro em dias entre os grupos estudados,

observamos que esse intervalo de tempo está associado a grande diferença de volume de neoplasia na pleura, conforme observado nos animais sacrificados após 3 e 7 dias da injeção celular de 50mil células de Lewis. Estes indivíduos foram utilizados como os controles do desenvolvimento da doença (vide figuras 1 e 2).

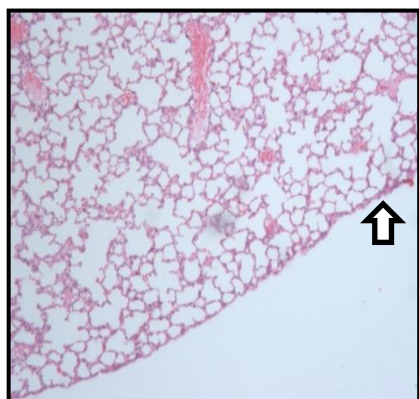


Figura 1. Pleura do camundongo com 3 dias de doença. Notamos a presença de poucas células neoplásicas aderidas na pleura visceral.

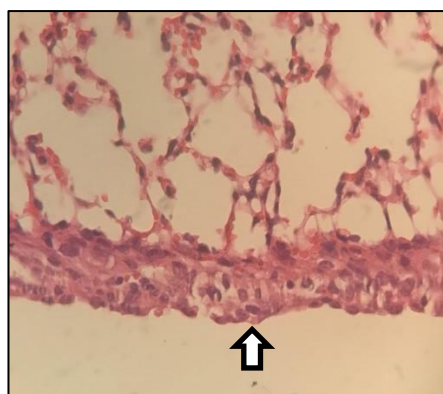


Figura 2. Pleura do camundongo com 7 dias de doença. Notamos a presença de conglomerado de células neoplásicas aderidas na pleura visceral.

Para confeccionarmos as lâminas demonstradas acima, padronizamos o corte histológico da pleura no local de maior quantidade de células neoplásicas agrupadas e quantificamos sua maior medida, desde a lâmina elástica até o final do conglomerado celular.

Os tempos utilizados nos grupos controle (animais injetados com soro fisiológico 0,9%) para a pleurodese foram exatamente os mesmos.

Após a pleurodese com talco no 3º dia (pleurodese precoce) e 7º dia (pleurodese tardia), a contar do tempo de injeção de células de Lewis ou violação pleural, os animais foram sacrificados em 2 períodos distintos de acordo com o objetivo da análise:

1.PERIODO INFLAMATÓRIO: 24 horas após a pleurodese. Chamamos este período de Período Inflamatório pois é o momento que temos o maior pico de ação das citocinas pleurais após a pleurodese. Nesse período avaliamos a inflamação pleural, refletida por citocinas e marcadores inflamatórios.

2. PERIODO FIBRÓTICO: 8 dias da pleurodese. Chamamos este período de Período Fibrótico pois é o tempo necessário para o surgimento do colágeno, sem que tivéssemos óbito dos animais por acometimento neoplásico (nos grupos câncer). Nesse período avaliamos a fibrose resultante da pleurodese, por meio da análise macro e microscópica dos animais, além do Picrosirius.

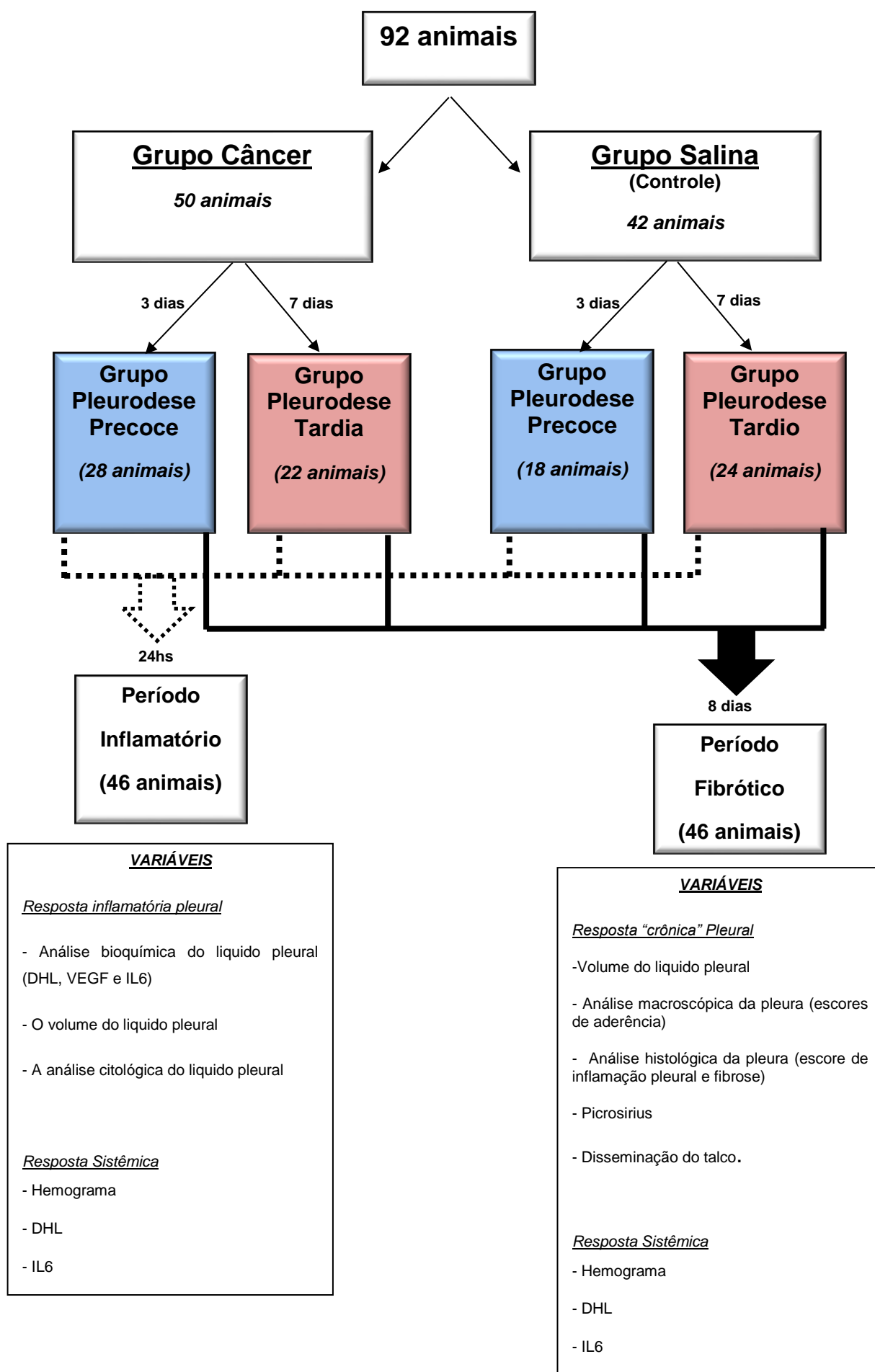
Demonstramos esquematicamente a seguir as subdivisões e tempos utilizados no experimento.

4.3 Grupos experimentais

Os animais utilizados foram todas fêmeas, com peso e idade semelhantes. Todos eles tiveram livre acesso à água e à alimentação apropriada.

Apresentamos esquematicamente abaixo a subdivisão dos grupos, os tempos utilizados e as análises realizadas.

Figura 3. Algoritmo da subdivisão dos grupos, tempos e análises realizadas no estudo



Onde:

Grupo Câncer Grupo de animais com neoplasia pleural

Grupo Salina: Grupo de animais injetados na pleura soro fisiológico, com a finalidade de violar o espaço pleural, constituindo assim, um grupo controle adequado.

No Grupo Câncer:

- **Grupo Pleurodese Precoce:** Grupo com Câncer, submetidos a pleurodese com 3 dias de doença
- **Grupo Pleurodese Tardia:** Grupo com Câncer, submetidos a pleurodese com 7 dias de doença

No Grupo Salina (grupo controle)

- **Grupo Pleurodese Precoce:** Grupo injetado com Soro Fisiológico submetidos a pleurodese após 3 dias de violação pleural.
- **Grupo Pleurodese Tardia:** Grupo injetado com Soro Fisiológico submetidos a pleurodese após 7 dias de violação pleural.

4.4 Descrição dos Procedimentos

A) Indução da doença pleural

Para o desenvolvimento da neoplasia pleural, após anestesia por injeção intraperitoneal de 35mg/kg de ketamina (Cristália, Brasil) e 5mg/kg de xylazina (Bayer, Brasil), os camundongos foram posicionados em uma mesa cirúrgica e a pele da região torácica limpa com álcool a 70%.



Figura 4 - Demonstração da anestesia intraperitoneal no camundongo

No Grupo Câncer (50 animais) foi inserida uma agulha 23-G no espaço pleural direito para a injeção por diferença de pressão de 0,5 ml de solução contendo $0,5 \times 10^5$ células neoplásicas. Terminada a instilação, todo o sistema foi imediatamente removido, para prevenir a entrada de ar inadvertidamente na cavidade pleural.

No Grupo Salina (42 animais) foram feitos os mesmos procedimentos, porém com instilação de 0,5ml de Soro Fisiológico 0,9% no espaço pleural.



Figura 5 - Esquema de injeção intrapleural nos camundongos

B) Pleurodese

Para pleurodese, os animais foram novamente anestesiados por injeção intraperitoneal de 35mg/kg de ketamina (Cristália, Brasil) e 5mg/kg de xylazina (Bayer, Brasil). Após a anestesia, os camundongos foram posicionados na mesa cirúrgica e a pele da região torácica foi limpa com álcool a 70%.

Após esse preparo, foi inserida uma agulha 19-G no espaço pleural direito e injetada solução de talco estéril na concentração de 400mg/kg para a pleurodese, em dias diferentes de acordo com o desenvolvimento da doença, no 3º e 7º dias posteriores a indução da doença ou violação pleural. Terminada a pleurodese, todo o sistema foi imediatamente removido, para prevenir a entrada de ar inadvertidamente na cavidade pleural.



Figura 6 - Esquema de pleurodese com talco no camundongo

C) Eutanásia e Preparo dos órgãos e tecidos

Os camundongos foram eutanasiados através de injeção intraperitoneal de 35mg/kg de ketamina (Cristália, Brasil) e 5mg/kg de xylazina (Bayer, Brasil), em duas fases distintas: metade dos subgrupos foram eutanasiados 24hs após a pleurodese e a outra metade 8 dias após a pleurodese, de acordo com as finalidades e tempos já descritos.

Após constatado óbito, o animal foi posicionado na mesa cirúrgica e realizada incisão mento-púbica para acesso total aos órgãos.

O tórax foi removido em bloco e os pulmões expandidos e fixados em formol a 10% e temperatura ambiente.

O líquido pleural foi coletado por punção transdiafragmática com agulha 19-G, para quantificação volumétrica e análise. Medimos o volume de líquido pleural coletado, e acondicionamos em tubos com o anticoagulante ácido diaminoetiltetracético (EDTA) para avaliação citológica (contagem total de células e diferencial de leucócitos) e, através de técnica imunoenzimática (ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*), analisamos os níveis de IL6, VEGF e DHL de acordo com as recomendações do fabricante.

A coleta de sangue foi realizada através de punção da veia cava inferior abdominal com agulha 19-G e acondicionamos em tubos com o anticoagulante ácido diaminoetiltetracético (EDTA) para avaliação citológica (contagem total de células e diferencial de leucócitos) e, através de técnica imunoenzimática (ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*), analisamos os níveis de IL6 e DHL de acordo com as recomendações do fabricante.

Fígado, baço e rim foram ressecados e submetidos a corte transilar para amostra tecidual. Posteriormente foram fixados em formol a 10% e temperatura ambiente para posterior análise da disseminação do talco

4.5 Avaliações

Para as avaliações dos graus de fibrose macro e microscópico, os tórax removidos em bloco foram examinados após 48 a 72 horas, fizemos o exame macroscópico da cavidade pleural e analisamos os graus de fibrose macroscópica de acordo com as tabelas. Cortes de pleura realizados em locais de maior aderência visualizada na macroscopia foram submetidos a exame microscópico e análise microscópica do grau de inflamação e fibrose de acordo com as tabelas descritas abaixo.

Para avaliar a quantidade de colágeno na pleura do animais, lâminas foram coradas pelo reagente Sirius Red (método de picrosirius), e quantificamos o colágeno tipo I, tipo III e total através de um analisador de imagem com software específico. (Q500IW Imaging Sistema (Leica Ltd, Cambridge, UK), na mesma localização onde encontramos maior quantidade dos elementos inflamatórios.

Este método de coloração é específico para colágeno e consegue distinguir seus padrões de agregação física. No colágeno imaturo (fino) identificamos as fibras como estruturas levemente birrefringentes na tonalidade verde enquanto as fibras maduras (grossas) são identificadas por forte birrefringência e coloração amarela ou vermelha.

O sangue e o liquido pleural coletados foram preparados segundo recomendações do fabricante e analisados os parâmetros já descritos.

Para analisar se o tempo de evolução da doença neoplásica pleural é o fator que influencia na segurança da pleurodese com talco em camundongos, de acordo com a quantidade de disseminação de talco, sortearmos aleatoriamente 2 animais pertencentes aos 4 grupos do período fibrótico para a avaliação da dispersão extrapleural de talco.

Foram preparados para análise microscópica, fragmentos de pulmão direito, rins, baço e fígado dos animais, os quais foram retirados fragmentos para inclusão em parafina. Os blocos de parafina foram submetidos à corte histológico de 3 mm e corados por hematoxilina-eosina (HE) para análise por microscopia óptica e luz polarizada para pesquisa de partículas de talco.

A obtenção de fragmentos obedeceu a uma padronização com o objetivo de homogeneização das amostras. Para os pulmões foram retirados fragmentos dos lobos inferiores. Os demais órgãos foram seccionados transversalmente e retirados fragmentos incluindo o hilo renal e esplênico.

Para o estudo da presença de partículas de talco nos órgãos, sob objetiva x10, utilizamos o programa de análise de imagem (LEYCA QWIN, EUA) e avaliamos 10 campos aleatórios. Em cada campo quantificamos a área total de parênquima e, por meio de detecção colorimétrica, a área ocupada por partículas de talco.

4.6 Coleta dos dados e análises de acordo com os períodos

4.6.1 Período inflamatório

O PERÍODO INFLAMATÓRIO (24hs após a pleurodese), foi assim denominado por ser o momento de pico de ação das citocinas, conforme descrito anteriormente.

Para avaliar a resposta inflamatória aguda pleural, medimos as seguintes variáveis:

Resposta Inflamatória Pleural

- A análise bioquímica do líquido pleural (DHL, VEGF e IL6)

- O volume do líquido pleural
- A análise citológica do líquido pleural

4.6.2 Período fibrótico

O PERÍODO FIBRÓTICO (8 dias após a pleurodese) foi assim chamado por ser o período suficiente para formação de aderências. Com esse tempo, também conseguimos manutenção do animal viável, conforme discussão prévia e achados dos pilotos (Anexo 1).

Avaliamos a resposta “sub aguda/crônica” à pleurodese neste período através das variáveis abaixo:

Resposta “crônica” Pleural

- A) Volume do líquido pleural
- B) Análise macroscópica da pleura (escores de aderência)
- C) Análise histológica da pleura (escore de fibrose e inflamação pleural)
- D) Picrosirius
- E) Pesquisa da disseminação do talco.

Descrição das tabelas utilizadas

A) Análise do grau de aderências (Fibrose macroscópica)

A presença de aderências macroscópicas foram avaliadas de acordo com uma escala semi-quantitativa⁶², recebendo escores de 0 a 4:

	Achados Macroscópicos	Classificação	Escore
	Ausência de aderências	Ausente	0
	1-3 aderências, sem sínfise	Minima	1
	3 ou mais aderências localizadas, sem áreas de sínfise	Leve	2
	Múltiplas aderências, com áreas isoladas de sínfise	Moderada	3
	Múltiplas aderências com sínfise completa da cavidade pleural	Intensa	4

Tabela 1 - Escores macroscopicos de acordo com a tabela

B) Análise do grau de inflamação pleural e fibrose microscópica

A inflamação pleural (parietal e visceral) foi avaliada semi-quantitativamente⁶² em lâminas coradas por HE, graduadas de 0 a 4 de acordo com a densidade de células inflamatórias, deposição de fibrina e presença de vasos neoformados, na região da lamina onde identificarmos maior quantidade desses elementos.




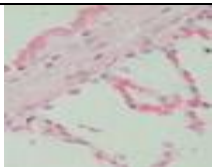
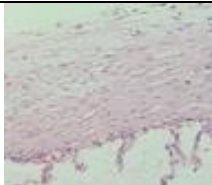
	Alteração histológica	Escore
	Pleura normal	0
	Alteração mínima	1
	Leve	2
	Moderada	3
	Intensa	4

Tabela 2- Escore semi quantitativo de inflamação (0-4)

4.6.3 Resposta sistêmica

A resposta sistêmica foi avaliada nos PERIODOS INFLAMATÓRIO E FIBRÓTICO de acordo com as variáveis coletadas no sangue:

- Hemograma
- DHL
- IL6

4.7 Análise estatística

4.7.1 Estatística descritiva

As análises descritivas para os dados quantitativos que apresentaram distribuição normal foram realizadas, apresentado as médias acompanhadas dos respectivos desvios padrão (+dp). Para os dados quantitativos sem distribuição normal, foram expressos através das medianas e intervalo interquartil IQ(25 – 75%). Os pressupostos da distribuição normal em cada grupo e a homogeneidade das variâncias entre os grupos foram avaliados respectivamente, com o teste de Shapiro-Wilk e com o teste de Levene. As variáveis categóricas foram apresentadas através de frequências e porcentagens.

4.7.2 Estatística inferencial

Para as variáveis quantitativas que apresentaram distribuição normal onde foram analisados dois fatores (grupo e tempo), foi utilizada a Análise de Variância de Duplo Fator (ANOVA). Quando a variável não apresentou distribuição normal, recorreremos ao teste de Mann Whitney para analisar os dois fatores (grupo e tempo). As variáveis categóricas foram analisadas com o teste de Qui Quadrado ou Exato de Fisher quando necessário.

Todas as análises foram realizadas no software SPSS 21 for Windows com nível de significância de $\alpha=0,05$.

5 Resultados

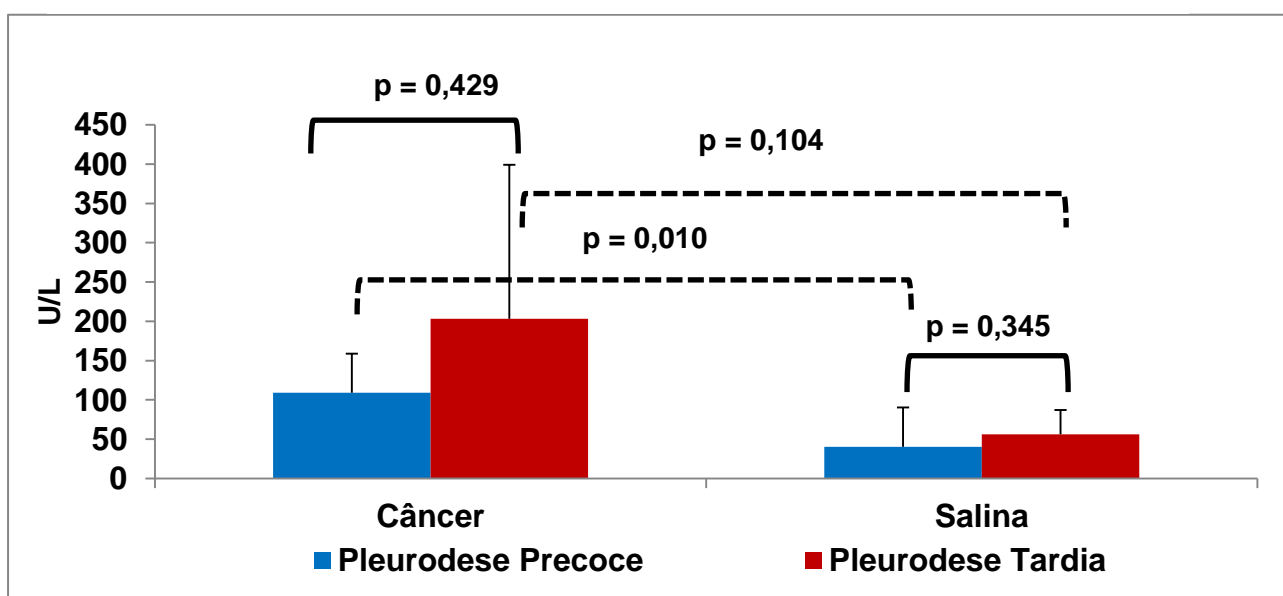
5.1 Resultados do Período Inflamatório

5.1.1 DHL líquido

Na comparação entre a pleurodese precoce e tardia, o valor da DHL não demonstrou diferença estatística.

Na comparação intragrupos, a DHL do líquido pleural é maior no Grupo Câncer quando comparado ao Grupo Salina nos animais com menor quantidade de doença pleural (Pleurodese Precoce) ($p=0,010$). No tempo Pleurodese Tardia, não houve significância estatística.

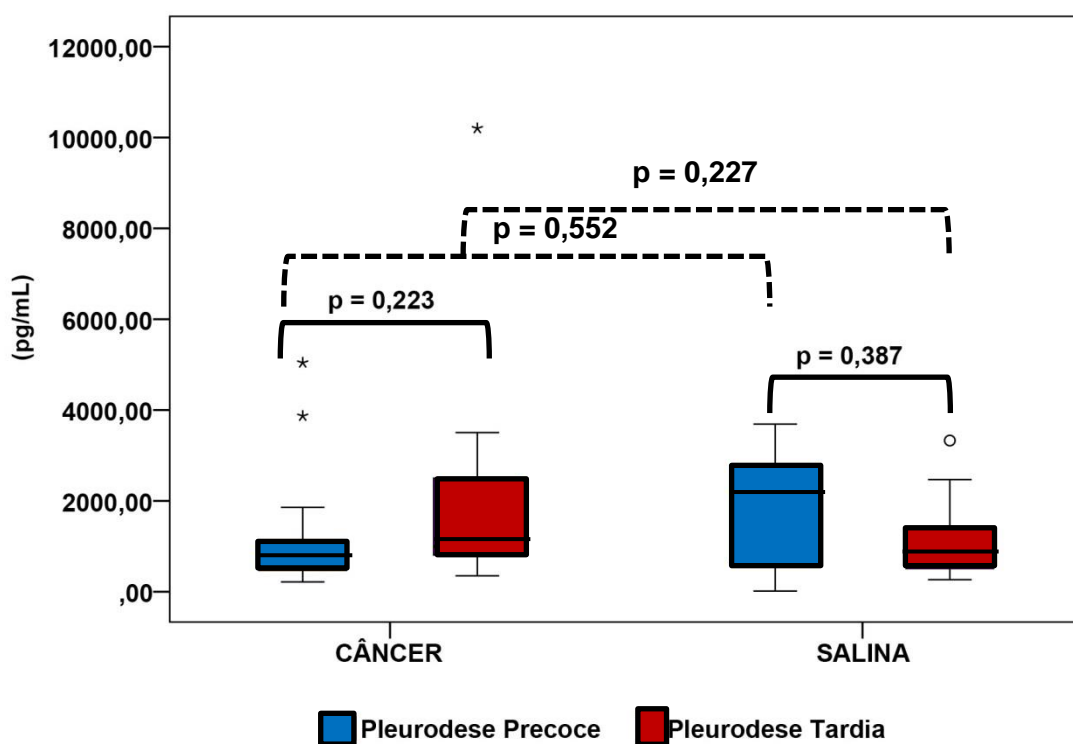
Gráfico 1- Comparação da variação do DHL no líquido pleural entre os grupos de pleurodese precoce e tardia e entre os grupos câncer e controle.



5.1.2 IL6 do líquido pleural

A Interleucina 6 não demonstrou diferença estatística nem entre os grupos, nem intra grupos.

Gráfico 2- Comparação da variação da IL-6 no líquido pleural entre os grupos de pleurodese precoce e tardia e entre os grupos câncer e controle.

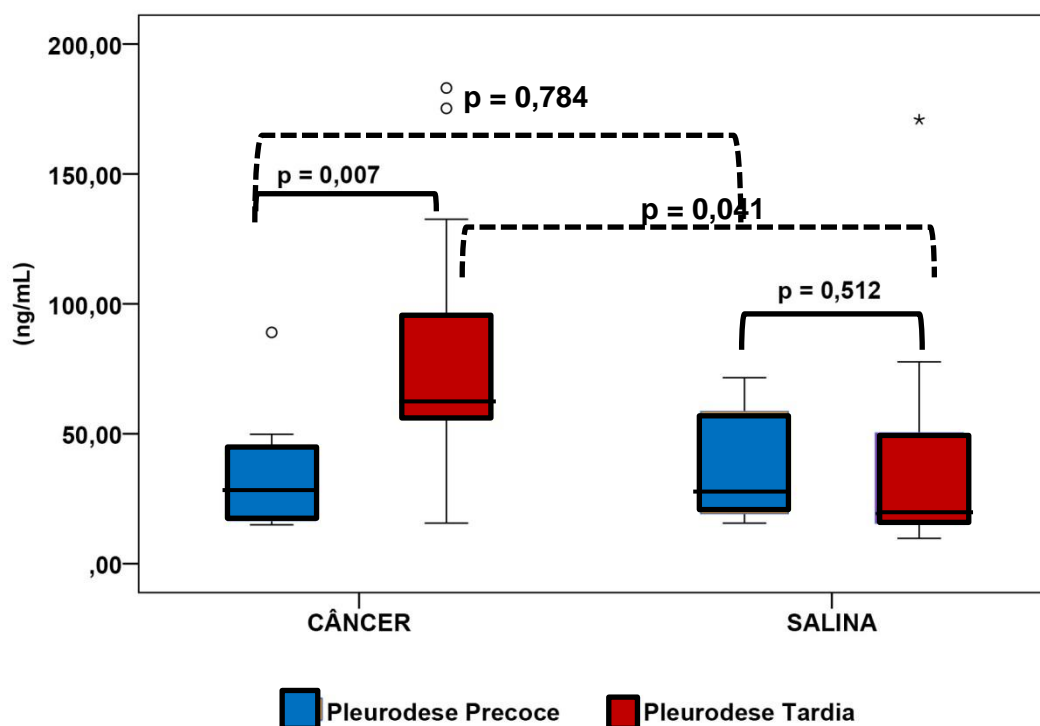


5.1.3 VEGF do líquido pleural

Na comparação entre a pleurodese precoce e tardia, o valor do VEGF é maior no Grupo Câncer quando comparado ao Grupo Salina no tempo Pleurodese Precoce ($p=0,010$). No tempo Pleurodese Tardia, não houve significância estatística.

Na comparação intragrupos, os níveis do VEGF no Grupo câncer são maiores na Pleurodese Tardia ($p=0,007$).

Gráfico 3- Comparação da variação do VEGF no líquido pleural entre os grupos de pleurodese precoce e tardia e entre os grupos câncer e controle.



5.1.4 Citologia do liquido pleural

Total de células do liquido pleural

Na comparação entre a pleurodese precoce e tardia, o total de células do liquido pleural foi maior na pleurodese tardia em ambos os grupos Câncer($p=0,013$) e Salina ($p=0,048$).

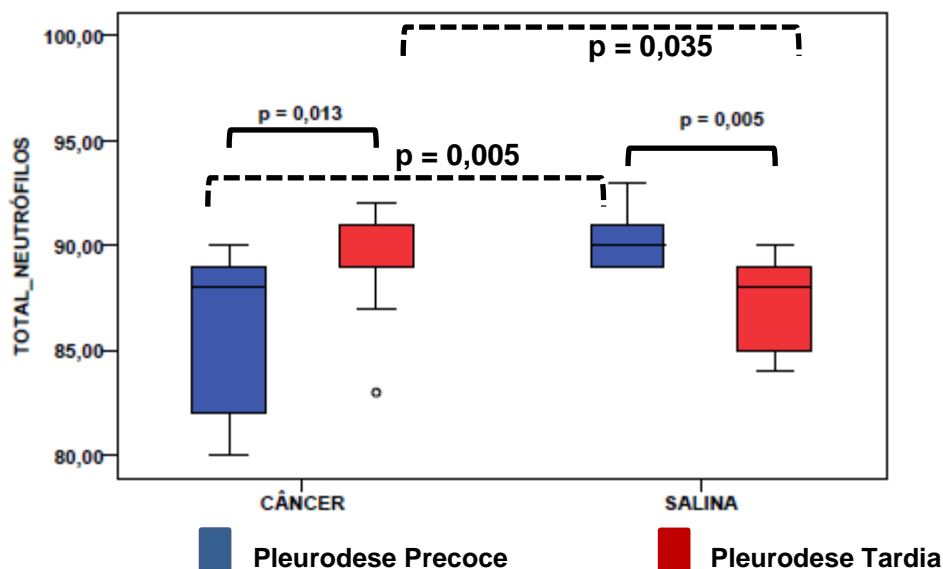
Na comparação intragrupos não houve significância para esta variável, conforme mostra o gráfico 1 do anexo 2.

Total de neutrófilos do liquido pleural

Na comparação entre a pleurodese precoce e tardia, os neutrófilos tiveram seus maiores índices no tempo Pleurodese Tardia no Grupo Câncer ($p=0,013$), enquanto no Grupo Salina, teve seu número aumentado no tempo Pleurodese Precoce ($p=0,005$).

Na comparação intragrupos o número de neutrófilos foi maior no Grupo Salina no tempo Pleurodese Precoce ($p=0,005$), enquanto este foi maior no Grupo Câncer no tempo Pleurodese Tardia ($p=0,035$).

Gráfico 4- Comparação do total de neutrófilos do liquido pleural entre os grupos de pleurodese precoce e tardia e entre os grupos câncer e controle.



Total de linfócitos do liquido pleural

Na comparação entre a pleurodese precoce e tardia, observamos grande diferença no total de linfócitos no tempo Pleurodese Precoce ($p=0,008$), não ocorrendo o mesmo no tempo Pleurodese Tardia.

Na comparação intragrupos observamos maior quantidade de linfócitos no grupo Câncer com menor quantidade de doença (pleurodese precoce), com $p=0,045$. No Grupo Salina não houve significância estatística para esta variável.

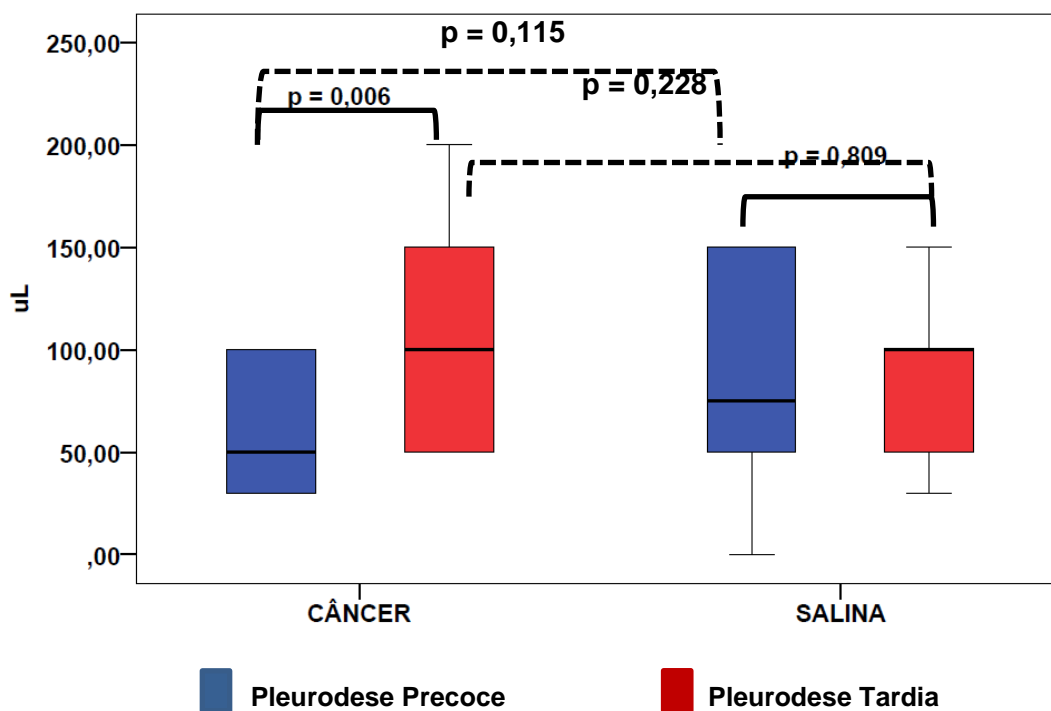
Dados disponíveis no gráfico 2 do Anexo 2.

5.1.5 Volume do liquido pleural (após 24hs de pleurodese)

Na comparação entre a pleurodese precoce e tardia, o volume do liquido pleural não demonstrou significância estatística após 24hs.

Na comparação intragrupos, o volume foi maior no Grupo Câncer quando submetido a Pleurodese Tardia ($p=0,006$).

Gráfico 5 - Comparação do volume do liquido pleural entre a pleurodese precoce e tardia e entre os grupos câncer e controle.

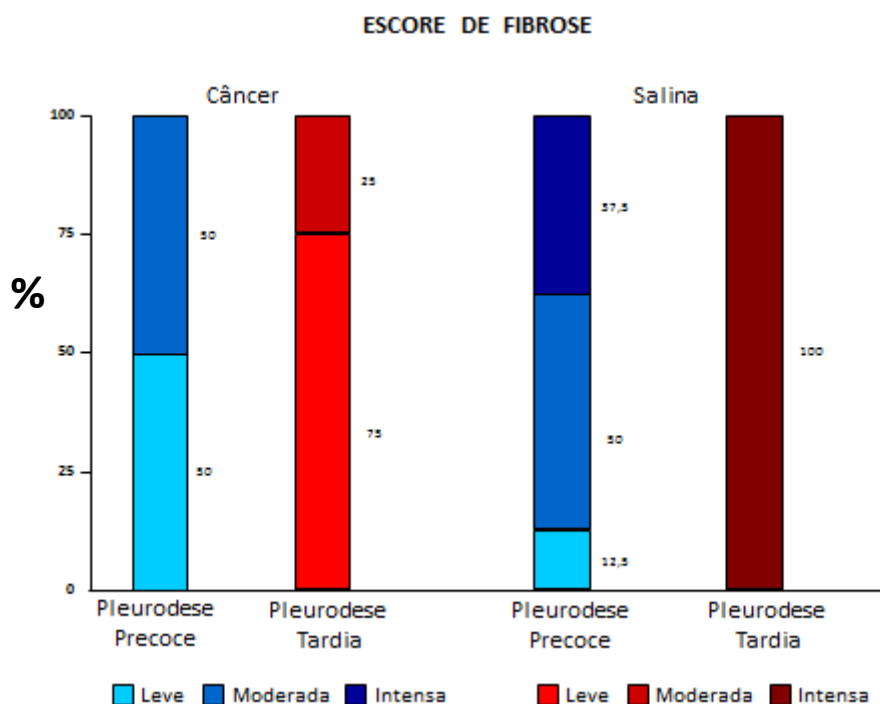


5.2 Resultados do Período Fibrótico

5.2.1 Escore de fibrose

Os escores de fibrose entre os grupos Câncer e Salina demonstraram diferenças estatisticamente significativas no tempo Pleurodese Precoce ($p=0,040$), com maior quantidade de fibrose intensa no Grupo Salina.

Gráfico 6 - Comparação da variação da fibrose entre a pleurodese precoce e tardia e entre os grupos câncer e salina



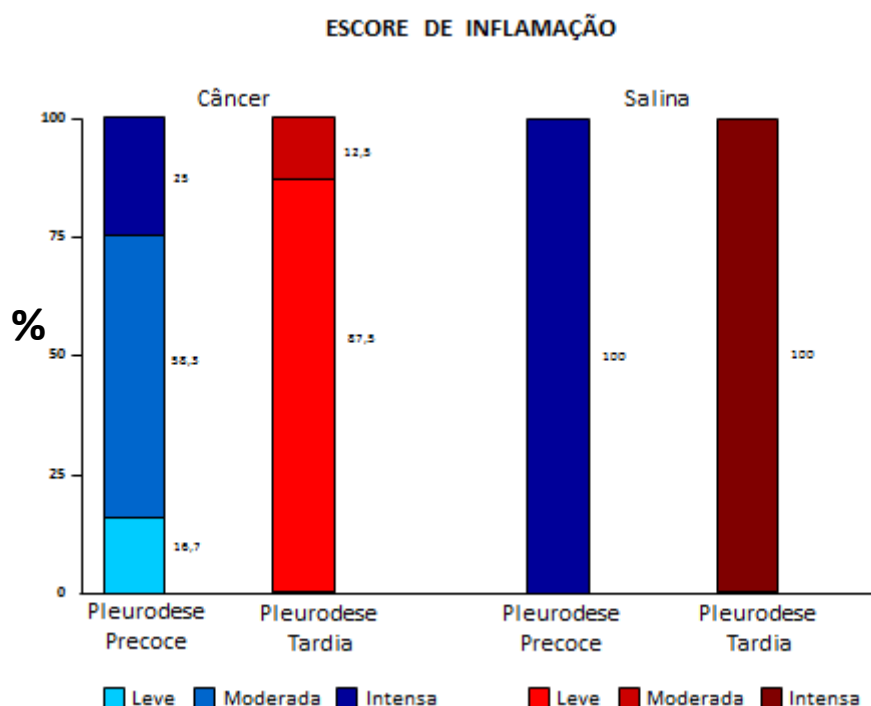
Os escores de fibrose foram ainda mais dispares entre os grupos Câncer e Grupo Salina quando comparados os resultados do tempo

Pleurodese Tardia ($p < 0,001$), com todos os animais do Grupo Salina tendo resultado máximo de fibrose.

5.2.2 Escore de inflamação pleural

No escore de inflamação do tempo Pleurodese Precoce (após 3 dias de injeção pleural), o Grupo Salina apresentou escore máximo de inflamação em todos os animais, com $p = 0,004$ quando comparado ao Grupo Câncer.

Gráfico 7 - Comparação da variação inflamação entre a pleurodese precoce e tardia e entre os grupos câncer e salina

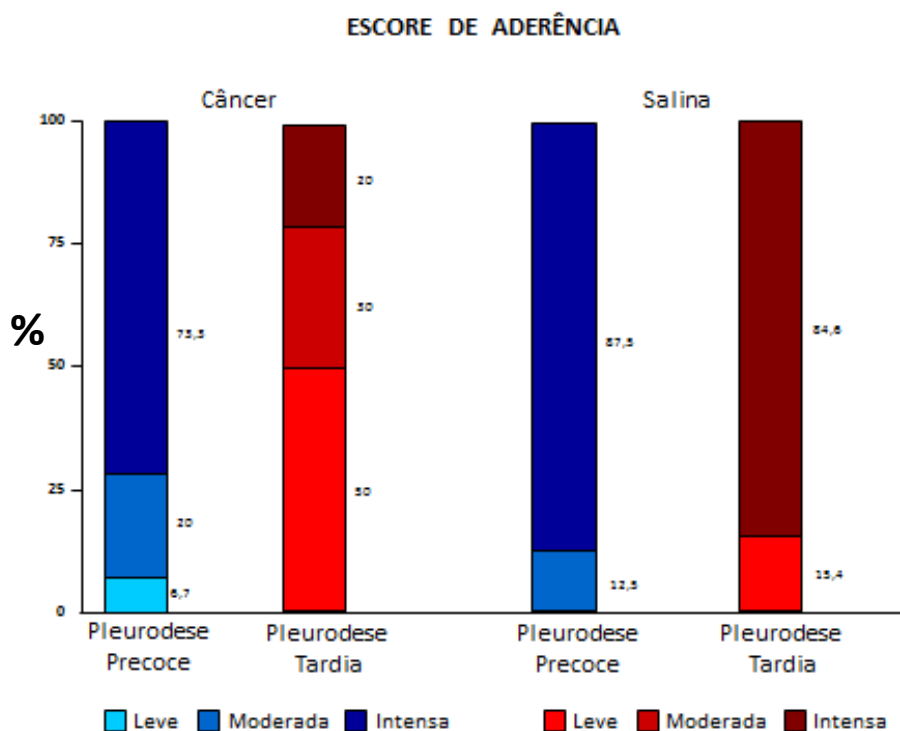


No escore de inflamação da Pleurodese Tardia (após 7 dias de injeção pleural), o Grupo Salina apresentou escore máximo de inflamação em todos os animais, enquanto o escore do Grupo Câncer diminuiu ($p < 0,001$).

5.2.3 Escore de aderência

No escore de aderência da Pleurodese Precoce (após 3 dias de injeção pleural), o Grupo Salina apresentou escores maiores quando comparado ao Grupo Câncer, mas sem significância estatística ($p=0,658$).

Gráfico 8 – Comparação da variação dos escores de aderência entre a pleurodese precoce e tardia e entre os grupos câncer e salina



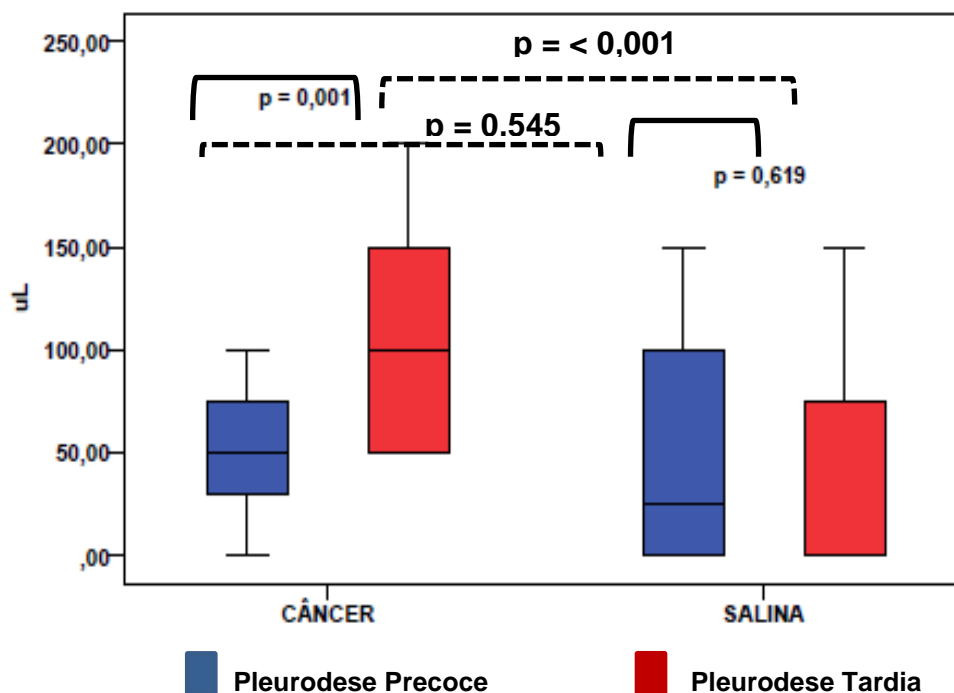
No escore de aderência da Pleurodese Tardia (após 7 dias de injeção pleural), o Grupo Salina foi o único que apresentou escore máximo, enquanto o Grupo Câncer teve seus escores diminuídos ($p<0,001$) quando comparado aos escores da pleurodese precoce.

5.2.4 Volume do líquido pleural (global)

No Grupo Câncer, a quantidade de líquido pleural é muito maior na Pleurodese Tardia quando comparada a Pleurodese Precoce ($p=0,001$). No Grupo Salina não houve diferença.

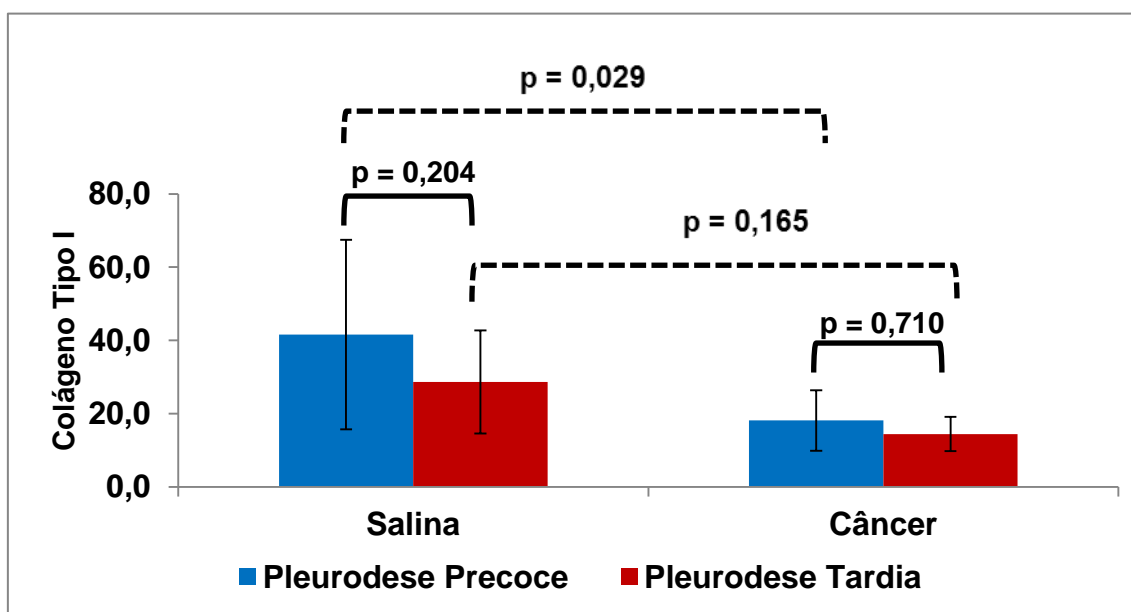
Na Pleurodese Precoce não houve diferença estatística entre os Grupos Câncer e Salina. No tempo Pleurodese Tardia, há maior quantidade de líquido no Grupo Câncer quando comparado ao Grupo Salina ($p<0,001$).

Gráfico 9 - Comparação da variação do volume do líquido pleural entre a pleurodese precoce e tardia e entre os grupos câncer e controle..



5.2.5 Quantidade de Colágeno

Gráfico 10 - Comparação da variação da quantidade de colágeno Tipo I entre a pleurodese precoce e tardia e entre os grupos câncer e controle.



Tivemos quantidade maior de colágeno na pleurodese precoce em ambos os grupos (Câncer e Salina). Ao compararmos os dois grupos, a maior diferença se deu dentro do tempo pleurodese precoce, sendo a maior quantidade no grupo salina.

5.3 Resultados da Resposta Sistêmica

5.3.1 Hemograma

Hematócrito

Na avaliação do hematócrito, houve diferenças entre o hematócrito do Grupo Câncer em ambos os tempos (Pleurodese Precoce e Pleurodese Tardia) ($p=0,015$). Houve queda no hematócrito dos animais do Grupo Câncer, enquanto os animais do Grupo Salina não tiveram alteração estatisticamente significativa. Na comparação entre os grupos dentro de cada tempo, notamos variação entre os grupos Câncer e Salina apenas no tempo Pleurodese Precoce, com tendência a valores pouco mais altos no grupo câncer, conforme disposto no gráfico 3 do anexo 2.

Hemoglobina

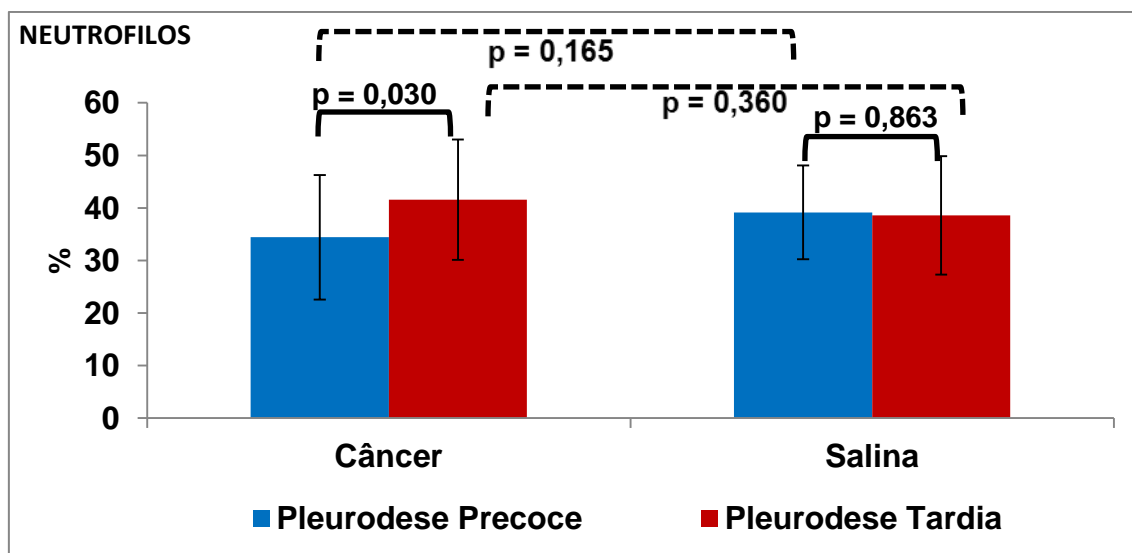
Em relação a hemoglobina, não houve variação estatisticamente significativa entre os tempos. Ao compararmos os grupos Câncer e Salina, houve diferença entre eles dentro dos tempos Pleurodese Precoce e Pleurodese Tardia, tendendo a ser pouco maior no Grupo Câncer, conforme mostra o gráfico 4 do Anexo 2.

Neutrófilos

Observamos um aumento no número de neutrófilos no Grupo Câncer, quando comparamos os grupos de acordo com o tempo Pleurodese Precoce e Pleurodese Tardia ($p=0,030$). No Grupo Salina, não houve alteração.

Na comparação entre os grupos de acordo com o tempo, notamos um comportamento inverso entre os dois: no tempo Pleurodese Precoce o Grupo Salina teve maior aumento de segmentados, enquanto no tempo Pleurodese Tardia o maior número encontrado foi no Grupo Câncer (ambos com $p > 0,05$).

Gráfico 11 - Comparação da variação dos segmentados entre a pleurodese precoce e pleurodese tardia e entre os grupos câncer e salina



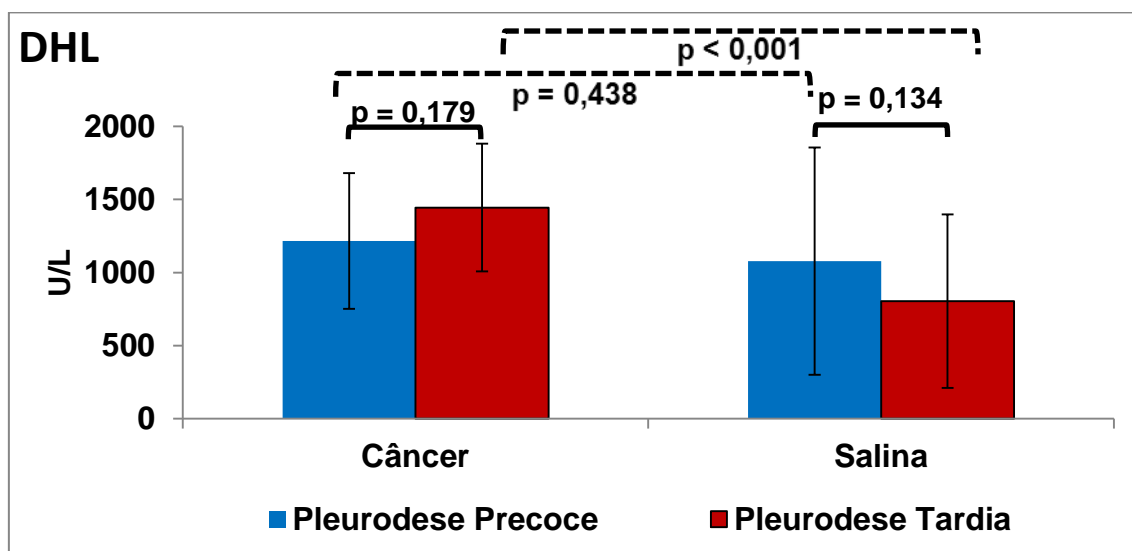
Linfócitos

Os linfócitos se mostraram elevados no Grupo Câncer no tempo Pleurodese Precoce, quando comparamos com o tempo Pleurodese Tardia ($p = 0,041$). O Grupo Salina não mostrou variação. Na Pleurodese Precoce, encontramos maior número de linfócitos no Grupo Câncer ($p = 0,062$). No tempo Pleurodese Tardia, não houve diferença significativa. Conforme mostra o gráfico 5 do Anexo 2.

5.3.2 Desidrogenase láctica sérica

Ao compararmos a variação do DHL sérico dentro dos Grupos Câncer e Grupo Salina de acordo com os tempos Pleurodese Precoce e Pleurodese Tardia, não obtivemos variação estatisticamente significativa. Na comparação entre os grupos Câncer e Salina, dentro dos tempos Pleurodese Precoce e Pleurodese Tardia, o DHL sérico no grupo câncer é maior que no grupo salina, com $p < 0,001$, na Pleurodese Tardia.

Gráfico 12 - Comparação da desidrogenase láctica sérica entre a pleurodese precoce e pleurodese tardia e entre os grupos câncer e salina.



5.3.3 Interleucina-6 sérica

Ao tentarmos mensurar a IL6 sérica, vimos não haver diferenças estatisticamente significantes em nenhum grupo avaliado, seja de acordo com o tempo ou tipo de injeção pleural (Câncer ou salina).

5.3.4 Distribuição sistêmica do talco

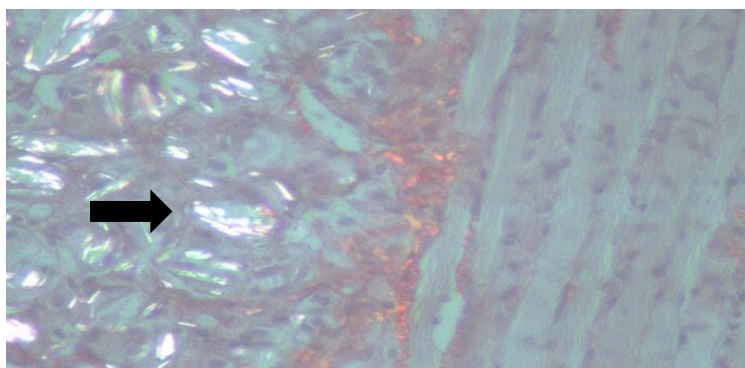


Figura 7 - Foto de corte histológico da pleura de camundongo submetido a pleurodese, demonstrando talco em meio a doença pleural (seta).

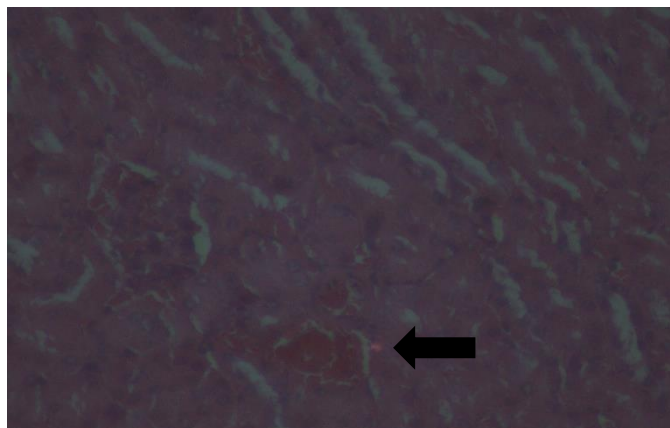


Figura 8 - Foto de corte histológico do baço de camundongo submetido a pleurodese, demonstrando partícula de talco no parênquima (seta).

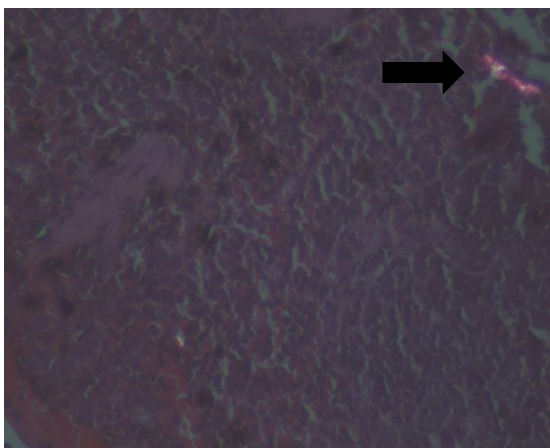


Figura 9 - Foto de corte histológico do fígado de camundongo submetido a pleurodese, demonstrando partículas de talco no parênquima (seta).

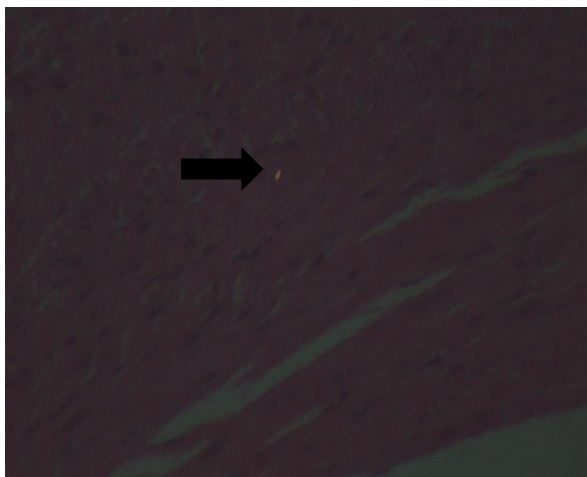


Figura 10 - Foto de corte histológico do coração de camundongo submetido a pleurodese, demonstrando partículas de talco no parênquima (seta).

Encontramos partículas de talco somente nos camundongos do grupo Câncer, no tempo pleurodese tardia.

Avaliamos se o tempo de evolução de doença neoplásica pleural está associado ao grau de fibrose pleural na pleurodese com talco, e descrevemos as alterações nos níveis pleurais de mediadores inflamatórios ativados pela pleurodese em diferentes tempos de evolução da doença neoplásica pleural; analisamos se o tempo de evolução da doença neoplásica pleural é o fator que influencia na segurança da pleurodese com talco em camundongos, de acordo com as variáveis descritas anteriormente.

Os valores do DHL do líquido foram maiores nos grupos pleurodese tardia (grupo Câncer tardio e Salina tardio), sendo os maiores valores encontrados nos animais com câncer, descrevendo uma curva ascendente, refletindo o maior acometimento pleural por neoplasia. Esse comportamento corrobora de certa forma com o estudo de Verma et. al⁴⁴, que sugere que quanto maiores os níveis de DHL no líquido pleural, menores os índices de sobrevida dos pacientes com Adenocarcinoma pulmonar e derrame pleural, pois poderia prever assim, o maior volume de doença neoplásica. Interessante, porém, foi o fato de acharmos o mesmo padrão de comportamento da curva no grupo controle. Acreditamos que além de predizer a presença de células neoplásicas no líquido pleural, o DHL refletiria a maior inflamação intrapleural, pois também foi cumulativo de acordo com o tempo de injúria pleural, seja neoplásica ou não. Isto posto, poderíamos sugerir que o valor alto do DHL poderia ser preditor negativo de sobrevida não só por refletir maior quantidade de doença, mas por trazer também outros prejuízos tanto pleurais, como diminuição da capacidade de ação antitumoral, quanto sistêmicos, devido a maior inflamação.

Não encontramos diferenças estatísticas nos níveis de IL-6 entre os animais do Grupo Câncer e Grupo Salina independente do tempo. Os trabalhos que correlacionam os níveis de IL-6 pleural após procedimento cirúrgico são descritos em suínos e demonstram que essa citocina sobe poucas horas após o procedimento e culminam em 16 a 48hs após a intervenção²⁷. Acreditamos os resultados encontrados em nosso estudo possa ser devido a curva de ação diferente na espécie estudada (camundongo). Outros pontos a serem citados são que em todos os grupos a pleura já havia sido violada pelo menos 72hs

antes(seja pela injeção de Soro Fisiológico ou Células de Lewis), além do fato da dificuldade na mensuração devido a quantidade mínima de líquido pleural, tendo em vista o tamanho do camundongo e conseqüentemente o volume disponível para análise.

Encontramos em nosso estudo um aumento do VEGF proporcionalmente ao volume de doença neoplásica pleural, corroborando com Zebrowski et. al, que descreveu números muito maiores de VGF em líquidos neoplásicos (ascite e liquor) do que os mesmos líquidos não acometidos por neoplasia⁶⁴. Nossos resultados podem inferir que o VEGF reflete a maior quantidade de tumor e conseqüentemente pior prognóstico, fato que já é aceito no caso do DHL⁴¹ nos linfomas.

Sabemos que o VEGF participa da formação dos derrames pleurais por aumentar a permeabilidade da barreira mesotelial e potencializar a passagem pela parede de capilares e vênulas³¹. Seus níveis tendem a aumentar paralelamente no líquido e no sangue, aumentando assim a permeabilidade capilar e contribuindo não só para o aumento do volume de líquido pleural, mas também para o aumento da passagem de pequenas moléculas do espaço pleural para o sangue⁴⁸ conforme sugere também Gary Lee et.al²⁹.

Não há estudos correlacionando os níveis de VEGF com o resultado final da pleurodese nem a segurança relacionado ao talco, mesmo com os indícios que o VEGF poderia refletir o volume de doença como citado por Swan et al, como no caso do DHL⁴¹, ou ao efeito no aumento da permeabilidade pleural⁵¹ que justificaria a maior dispersão de talco (conforme descrito a seguir) e conseqüentemente a piora da segurança da pleurodese em pacientes com maior acometimento pleural por neoplasia e níveis mais altos dessa citocina.

Partindo para o estudo celular do líquido pleural, encontramos o total de células no líquido pleural maior nos grupos Câncer e Salina tardios. Na comparação intragrupo e por razões óbvias, o maior valor foi encontrado nos animais do grupo câncer com 7 dias de doença. Na comparação entre os tempos, também houve diferença estatisticamente significativa. Acreditamos que o total de células além de refletir a presença da neoplasia pleural, mostra

uma resposta inflamatória maior (e corroborada também pelos valores do DHL e VEGF) e maior escarificação das células mesoteliais pela doença.

O que nos chamou atenção em relação ao total do número de células, foi que, ao contrário do que poderíamos esperar, o número de células e quantidade de inflamação foi inversamente proporcional ao sucesso da pleurodese quando comparamos os grupos, e conforme discutiremos a seguir.

Os neutrófilos tiveram comportamentos totalmente diferentes entre os grupos Câncer e Salina. No Grupo Câncer, os neutrófilos foram menores na pleurodese precoce, e maiores na pleurodese tardia, refletindo aparentemente uma inflamação constante e crescente na pleura, conforme Ferreira et. al⁶³. O número aumentado dessas células nos animais com mais doença pleural porém, não trouxe resultado prático: elas tiveram seu aumento em número absoluto, mas sem recrutamento de outras células nem ação inflamatória eficiente, conforme nossos dados referentes a IL-6.

No Grupo Salina, os neutrófilos atuaram inversamente, apresentando valores maiores no tempo pleurodese precoce e valores menores na pleurodese tardia. Nesse grupo, os índices de sucesso da pleurodese foram melhores também, conforme discutido adiante. Isso pode ter ocorrido devido ao grupo controle submetido a pleurodese precoce ter tido sua pleura injetada com soro fisiológico a menos tempo (3 dias), estando ainda com inflamação ativa, a qual foi potencializada após a pleurodese. O grupo pleurodese tardia (7 dias após a injeção de soro) teria a pleura já livre da inflamação inicial causada no dia da pleurodese.

Os linfócitos se comportaram de forma diferente dos neutrófilos. No líquido pleural do Grupo Câncer, obtivemos um número maior de linfócitos na pleurodese precoce, fazendo curva contrária aos neutrófilos, que tiveram maior número na pleura do grupo câncer. Isso pode ter acontecido seja por mudança no microambiente pleural ou pela incapacidade dos neutrófilos em recrutar-se, resultando em inflamação mais insidiosa da pleura doente, e índices de sucesso da pleurodese ainda mais baixos no grupo Câncer e pleurodese tardia. No Grupo Salina, não houve diferença estatisticamente significativa entre a pleurodese precoce e tardia.

Ao analisarmos os volumes do líquido pleural de todos os animais (24hs e 8 dias após a pleurodese), observamos dentro do Grupo Câncer volumes muito maiores na pleurodese tardia em comparação com a pleurodese precoce, traduzindo aqui o efeito do VEGF, tendo em vista os grupos com maiores índices dessa citocina terem os maiores volumes de líquido pleural ⁶⁵. Talvez o maior volume de líquido também interfira no resultado final da pleurodese por diminuir o contato entre as pleuras.

Nossos dados corroboram com os poucos estudos correlacionados ao tema, onde o volume de doença é proporcional aos índices de VEGF e consequentemente ao volume do líquido pleural³⁶.

Os escores de fibrose pleural nos Grupos câncer foram significativamente mais baixos que os observados nos grupos salina. Tal fato foi mais significativo na pleurodese tardia quando comparado a pleurodese precoce, sugerindo que a doença neoplásica na pleura estaria associada a uma menor ocorrência de fibrose pleural. Tal achado já havia sido sugerido por Panadero e cols.⁶⁶ dizendo que o maior volume de células tumorais na pleura também implicariam em menor número de células mesoteliais expostas ao agente esclerosante, e portanto a pleurodese (processo mediado pelas células mesoteliais) também seria prejudicado. Bielsa e cols ⁸, em estudo retrospectivo de 450 casos de pleurodese com talco, também obtiveram correlação negativa entre o volume pleural de doença neoplásica e resultado final da pleurodese, porém de acordo com as regressões logísticas, o volume de doença por si só não explicaria a falha da pleurodese, considerando o tipo de célula tumoral preditor independente (pacientes com câncer de pulmão e mesotelioma tiveram os piores resultados). Um achado paralelo interessante dentro do grupo salina foi que 100% dos camundongos no grupo salina tardio tiveram fibrose intensa enquanto apenas 37,5% do grupo salina precoce tiveram o mesmo escore. Tal fato poderia ser explicado pela questão do tempo de violação pleural neste último ter sido mais curto (apenas de 72hs), criando um microambiente pleural mais inflamado. Dessa forma, os menores índices de fibrose encontrados seria devido aos baixos índices de glicose e pH (72,73), mimetizando, em parte, o microambiente neoplásico.

A inflamação mensurada teve comportamento semelhante ao já descrito para fibrose. Na pleura sadia, após a instilação de talco, ocorre um rápido influxo de neutrófilos no espaço pleural em 24hs⁶⁹; não existem estudos relacionados na pleura neoplásica. Em nosso estudo, o subtipo celular que nos trouxe diferença estatística foram exatamente os neutrófilos: os maiores índices obtidos foram no grupo câncer tardio e salina precoce; ou seja, mesmo com número de neutrófilos absoluto semelhante, as respostas foram extremamente diferentes, resultando em menor volume de fibrose no grupo câncer tardio. Segundo Jantz e cols, isso poderia ocorrer pois além de ativar menos a cascata inflamatória, o menor número de células mesoteliais expostas ao talco causaria maior fibrinólise intrapleural, tendo em vista tais células regularem também o equilíbrio da coagulação intrapleural, um dos primeiros passos para o sucesso da pleurodese⁷⁰.

Vemos isso também no escore de aderência (fibrose macroscópica): este não apresentou variação estatisticamente significativa entre os grupos precoces de Salina e Câncer, o que reflete que a pleurodese foi tão eficaz no grupo Câncer quanto no Grupo Salina quando feita precocemente. Ao contrário do que encontramos na pleurodese tardia: 84,6% dos animais do Grupo Salina tiveram aderência intensa, enquanto nenhum do grupo Câncer apresentou esse escore, inclusive piorando os índices proporcionalmente ao aumento do volume da doença, conforme sugere a literatura^{8,66}.

Na comparação da quantidade de colágeno pelo método de Picrosirius, tivemos maiores índices nos grupos salina; a maior diferença estatística obtida foi ao compararmos a pleurodese precoce entre os os grupos salina e câncer. Isso significa que mesmo com pouca doença pleural a pleurodese já fica comprometida quando comparada a pleura sadia: o grupo câncer precoce e câncer tardio não tiveram diferença estatística entre si na formação de colágeno, mas os dois tempos tiveram menor quantidade de colágeno quando comparado a qualquer tempo nos camundongos do grupo salina.

Acreditamos que não obtivemos números ainda maiores pois o tempo para o desenvolvimento do colágeno possa ter sido muito curto (devido as restrições de tempo de sobrevivência dos animais, conforme discutido

previamente). Mesmo assim, aparentemente, a curva continuaria com a tendência de demonstrar diferença ainda maior entre os grupos.

Os dados obtidos em nosso estudo em relação a resposta inflamatória pleural e formação de fibrose pleural nos sugere uma certa desproporção entre a inflamação celular (refletida pela celularidade do líquido pleural, VEGF e DHL), entre os grupos salina e câncer, com tendência expressivamente maior no segundo. Mesmo com essa diferença, aparentemente, o resultado final da cascata inflamatória e consequente formação de fibrose parece estar prejudicada.

Para estudarmos a resposta sistêmica, avaliamos os hemogramas, DHL sérico e interleucina-6.

A resposta sistêmica a pleurodese foi semelhante nos camundongos submetidos a pleurodese nos grupos câncer e salina, a exceção da análise do hemograma em relação aos segmentados, que foi maior nos camundongos do grupo Câncer tardio. Genofre et al ⁷¹ sugeriu que o aumento de neutrófilos na circulação sistêmica após a pleurodese poderia ser devido a passagem de partículas de talco ou a passagem das próprias células da cavidade pleural para o sangue, refletindo a inflamação pleural^{72,73}. Após análise dos nossos dados, acreditamos que seja mais relacionado a circulação de talco, pois obtivemos valores semelhantes de neutrófilos no líquido pleural nos subgrupos salina, que não refletiram esse aumento na resposta sistêmica. Dessa forma, o maior volume de doença pleural provavelmente induz uma resposta sistêmica maior, ou permite uma maior penetração do talco na circulação sistêmica, causando uma resposta inflamatória sistêmica mais exacerbada, refletida também pelo DHL sistêmico, cujos maiores índices foram obtidos no grupo câncer tardio, corroborando com Swan et.al quanto ao reflexo de volume de doença, não especificamente adenocarcinoma⁷⁴.

Assim como estudos prévios ⁵⁰, encontramos partículas de talco nos cortes de fígado, baço e rins somente nos animais com neoplasia pleural mais avançada (grupo câncer tardio). Acreditamos que isso possa ser o reflexo também (além da maior presença de células neoplásicas na pleura), a maior permeabilidade pleural induzida pelo VEGF o qual discutimos anteriormente ⁶⁵.

Em relação a dispersão sistêmica do talco, encontramos partículas somente nos camundongos com neoplasia pleural submetidos a pleurodese após o 7º dia de desenvolvimento da doença.

De acordo com nossos achados, portanto, a maior quantidade de doença além de resultar em menor formação de colágeno e consequentemente aderências, pode resultar em menor defesa pleural em relação à dispersão do talco devido a menor quantidade de células mesoteliais e maiores índices de citocinas pleurais^{29,30}. Dentre estas, a principal seria a VEGF, que com o aumento da permeabilidade pleural, deixa os canais mais abertos e propensos a passagem do talco para a corrente sanguínea, inflamando mais o camundongo e consequentemente, sendo menos segura.

Dentre as limitações encontradas em nosso estudo, podemos citar a literatura extremamente escassa em relação ao tema e necessidade de adaptação de outros estudos para o nosso. Tivemos, por exemplo, que usar a literatura relacionada a IL-6 pleural somente em cães²⁷. Isso nos restringiu em relação à interpretação dos nossos resultados em camundongos.

O tamanho do animal e consequentemente os volumes que obtínhamos (volume de líquido pleural e volume sanguíneo) também foram pontos críticos no estudo tendo em vista a quantidade de análises necessárias, principalmente nos dados coletados após 24hs do procedimento.

7 Conclusões

O tempo de evolução da doença neoplásica pleural é inversamente proporcional aos graus de fibrose macroscópica e fibrose microscópica pleurais (assim como a quantidade de aderências a colágeno pleurais) em camundongos submetidos a pleurodese com talco. Na prática, quanto maior o volume de doença, menor o sucesso da pleurodese.

Os níveis pleurais de VEGF e DHL seguiram curva ascendente proporcional ao desenvolvimento da doença. Já a resposta celular teve maior quantidade de neutrófilos e menor de linfócitos nos camundongos com mais doença. O volume de líquido foi consideravelmente maior neste grupo.

O tempo de evolução da doença neoplásica pleural influenciou a segurança da pleurodese nos camundongos: os animais com maior quantidade de doença tiveram maior resposta sistêmica, demonstrada pela maior quantidade de resposta celular (aumento dos índices de neutrófilos), e pelo aumento do DHL. Somado a estes fatos, o único grupo a apresentar dispersão de talco em seus órgãos foi o grupo com maior quantidade de doença neoplásica pleural.

ANEXO 1 – Pilotos

8.1 Considerações iniciais dos experimentos realizados

Já são descritos modelos animais com indução de acometimento pleural neoplásico, porém, com quantidade de células neoplásicas utilizadas nos principais estudos descritos de 100mil células/camundongo. Nestes estudos, o acometimento pleural se desenvolveu muito rápido e também se mostrou muito intenso em volume de doença, fazendo com que a sobrevivência do camundongo geralmente não ultrapassasse 14 dias e ainda assim, com muitas perdas após 7 dias de doença. Com estes modelos descritos, não conseguiríamos realizar estudos em função do tempo, principalmente no que tange o desenvolvimento de fibrose macroscópica na pleura.

Posto isso, fez-se necessário o desenvolvimento de novo modelo animal para avaliação destes e de outros parâmetros, nos quais seus estudos eram limitados pelas barreiras descritas anteriormente.

Foram realizados três Estudos Pilotos no Laboratório de Pesquisa Experimental do Instituto do Coração (InCor), baseado no projeto anterior, sob número CEUA 08115, com a finalidade de desenvolvimento de modelo para o estudo final proposto neste projeto.

Para indução de neoplasia foram utilizados camundongos C56Black, com peso entre 26 a 30 gramas. Os animais foram anestesiados com cetamina (Cristália, São Paulo-Brasil) 5mg/ml e xilazina (Bayer, São Paulo-Brasil) 2mg/ml, em solução de 2:1, sendo injetados 0,02ml em cada camundongo, intraperitoneal, em quadrante inferior esquerdo. Para indução da neoplasia pleural, foi confeccionada solução contendo células de Lewis, previamente preparadas em meio de cultura de acordo com estudos prévios, e tituladas de

acordo com o objetivo do piloto, de acordo com as descrições abaixo, utilizando como diluente Soro Fisiológico 0,9%, contando posteriormente com ajuste de concentração e contagem em câmara de Neubauer, para obtermos solução em “X” mil células de Lewis por mililitro de Soro Fisiológico 0,9%.

Com os animais anestesiados, era realizada antissepsia do hemitórax direito com uma solução de álcool a 70% (Rioquímica, São Paulo, Brasil) e injetada solução no quarto espaço intercostal, usando scalp com agulha 22 gauge e seringa de 5 ml, em sistema aberto, posicionando o reservatório da seringa a 15 cm acima do animal, com intuito de injetar contando com a gravidade e pressão intratorácica negativa.

8.2 Piloto 1

Objetivo: Analisar a implantação celular e sobrevida dos camundongos injetados com 1mil células.

Métodos: Para realização deste estudo foram utilizados dez camundongos da raça C56Black com peso entre 26 a 30 gramas. Os animais foram anestesiados de acordo com o exposto anteriormente. Para indução do acometimento pleural, foi confeccionada solução contendo células de Lewis, na contagem de 1mil células por mililitro de Soro Fisiológico 0,9%. Com os animais anestesiados, foi realizada antissepsia do hemitórax direito e posterior injeção de 1 ml (total de 1000 células de Lewis) intrapleural, de acordo com as técnicas descritas anteriormente.

Os animais foram mantidos e observados até o 21o dia quando então foram sacrificados com a solução anestésica previamente descrita e usando a mesma técnica(porém com 2 ml de solução) e posteriormente seccionando e veia cava inferior para coleta de sangue e consequente exsanguinação. O tórax foi retirado em bloco e os pulmões expandidos com 5 ml de solução de

formalina a 10%, através de cateter plástico, posicionado na traqueia. A ligadura da traqueia foi realizada com fio de algodão e em sequência, o tórax foi submerso em formol a 10%, por no mínimo 48 horas. Posteriormente, foram realizadas incisões no diafragma e arcos costais na linha hemiclavicular. O esterno e as porções mediais dos arcos costais foram removidos para permitir ampla exposição da cavidade pleural. Fragmentos da pleura visceral foram obtidos para avaliação microscópica

Resultados: 2 animais morreram na indução anestésica. No período observado, um animal morreu no 2º dia (provavelmente por complicações do procedimento), um animal morreu no 10º dia e outros dois morreram no 19º dia, estes três últimos provavelmente já por comprometimento neoplásico, visto que a partir do 15º dia, já diminuem sua atividade no cativeiro. Dos quatro animais sacrificados contendo 1ml células, nenhum tinha derrame pleural. Nenhum deles perdeu peso. 50% deles tinham prováveis implantes macroscópicos na pleura, sendo que as lâminas ainda permanecem em análise para obtenção do resultado final.

Dia do óbito	Causa
D0 - 2 animais	Indução
D2 - 1 animal	Complicação de procedimento
D10 - 1 animal	Neoplasia
D19 - 2 animais	Neoplasia
D21 - 4 animais	Sacrifício

Conclusões: Mesmo utilizando menor número de células neoplásicas na solução celular, todos os animais estudados tinham implantes pleurais. Tivemos sobrevida média de 50% em 21 dias, com implantes macroscópicos em 50% deles, porém sem derrame pleural. Não houve perda de peso, mas aparentemente, os animais ficam menos ativos no decorrer do tempo.

8.3 Piloto 2

Objetivos: Analisa o sucesso da implantação de células tumorais e a extensão do acometimento na pleura de camundongos injetados com 50mil células de Lewis de acordo com o tempo.

Métodos: Neste estudo foram utilizados vinte camundongos da mesma raça e peso descrito anteriormente. Os animais foram anestesiados e injetados as células de Lewis utilizando as mesmas técnicas descritas, porém com solução, neste estudo, contendo 50mil células de Lewis por mililitro de soro fisiológico 0,9%.

Após a fase de injeção, os animais foram divididos em 3 grupos e sacrificados da mesma forma descrita em 5, 8 e 12 dias.

Resultados: 5 animais morreram na indução anestésica. Todos os outros animais tinham implantes pleurais de células neoplásicas independentemente do dia do sacrifício. Macroscopicamente, somente 2 animais sacrificados com 8 dias apresentaram implante macroscópico. Microscopicamente, visualizamos além da presença de tais células, sua implantação e infiltração até o plano da musculatura intercostal, formando aglomerados celulares grandes e densos; além disso, subjetivamente achamos que o numero de células bem como sua infiltração nos planos subjacentes tornaram-se maiores conforme aumentávamos o tempo. Em relação ao derrame pleural, 40% dos animais de cada subgrupo grupo o apresentaram, com volume médio de 2 ml, sem alteração desta quantidade de acordo com o tempo. Os animais não perderam peso durante o experimento.

Dia do Sacrificio	Achados
5dias	Implante Micro + 40%DP
8dias	Implante macroscopico + (2) Implante Micro ++ 40%DP
12 dias	Implante Micro++ 40%DP

Conclusões: O grau de acometimento aumenta de acordo com o tempo nos animais injetados com 50mil células e apresentam derrame pleural. Durante o tempo estudado, os animais não perderam peso e mantiveram atividade.

8.4 Piloto 3

Objetivos: Avaliar e comparar o resultado da pleurodese com nitrato e talco em camundongos injetados com 10mil células de Lewis

Métodos: Neste estudo foram utilizados vinte camundongos da mesma raça e peso descrito anteriormente. Os animais foram anestesiados e injetadas as células de Lewis utilizando as mesmas técnicas descritas, com solução neste estudo, contendo 10mil células de Lewis por mililitro de soro fisiológico 0,9%.

Após a fase de injeção, os animais foram divididos em 4 grupos, sendo realizada pleurodese com talco na concentração de 400mg/kg e nitrato de prata na concentração de 0,05% no 3º e 7º dia de doença e posteriormente sacrificados com a mesma técnica descrita 7 dias após a pleurodese (no 10º dia e 14º dia após injeção das células neoplásicas).

Desenho	
D0	Injeção de 10mil células 20 camundongos
D3 - Pleurodese	5 camundongos c Talco(NEOTL3)
	5 camundongos c Nitrato(NEONP3)
D7 - Pleurodese	5 camundongos c Talco (NEOTL7)
	5 camundongos c Nitrato (NEONP7)
D10	Sacrifício G1
D14	Sacrifício G2

Resultados: Nenhum animal morreu na indução anestésica. Todos os outros animais tinham implantes pleurais de células neoplásicas independentemente do dia do sacrifício. Nos animais submetidos à pleurodese no 3º dia de doença (após injeção de células neoplásicas) houve 1 morte em cada grupo (talco e pleurodese) e somente 1 morte no decorrer do experimento no grupo talco.

Nos animais submetidos à pleurodese no 7º dia após a injeção pleural, houve 1 morte no decorrer do experimento no grupo talco e 2 mortes no momento da pleurodese no grupo nitrato.

	20 animais	
	Grupo Talco (NEOTL)	Grupo Nitrato (NEONP)
3º Dia de Doença	1 óbito no tempo	1 óbito na pleurodese
Sacrifício no 10º dia após injeção	1 óbito na pleurodese <u>TOTAL:</u> 3 animais	<u>TOTAL:</u> 4 animais
7º Dia de Doença	1 óbito no tempo	2 óbitos na pleurodese
Sacrifício no 14º dia após injeção	<u>TOTAL:</u> 4 animais	<u>TOTAL:</u> 3 animais

Em relação aos achados macroscópicos, obtivemos os resultados descritos nas tabelas abaixo.

	3 Dias de Doença (D3)	
	Grupo Talco (NEOTL D3)	Grupo Nitrato (NEONP D3)
Animal 1	Aderência 2,0(em provável local de punção) Espessamento diafragma	Aderência 0
Animal 2	Aderência 0,5 Espessamento diafragma	Aderência 0
Animal 3	Aderência 0,5 Espessamento diafragma	Aderência 0
Animal 4	Aderência 2,0	----- -----

	7 Dias de Doença (D7)	
	Grupo Talco (NEOTL D7)	Grupo Nitrato (NEONP D7)
Animal 1	Aderência 2,5 Espessamento diafragma	Aderência 0,5 (Espessamento de pleura e diafragma)
Animal 2	Aderência 2,0 Espessamento diafragma	Aderência 0
Animal 3	Aderência 0 (Talcoma em subcutâneo)	Aderência 1
Animal 4	----- -----	Aderência 2 (aspecto nacarado em pulmão esquerdo)

Microscopicamente, todos tinham presença de fibroblastos e fibrose em pleura visceral. 2 lâminas de cada grupo foram coradas pelo método de Picrosirius para avaliação de fibrose local, sendo que todas obtiveram coloração positiva pelo método, inclusive em quantidade suficiente para quantificação em estudo posterior. A lâmina de corte de animal controle, somente com doença pleural obteve resultado negativo.

Conclusões: Os animais com este número de células implantadas tem sobrevida suficiente para o estudo e resposta satisfatória a pleurodese para que possamos quantificá-la de acordo com os métodos disponíveis. Não houve

perda de peso ou diminuição significativa de atividade dos animais no decorrer do tempo.

8.5 Conclusões dos pilotos

Após a realização dos 3 pilotos e tendo as análises em mãos, ainda tínhamos dúvidas em relação a qual modelo ideal para o estudo proposto. Levamos essas questões para discussão em reuniões e com outros pesquisadores (em nossas reuniões e em participação em congressos internacionais). Finalmente, optamos pela injeção de 50mil células de Lewis intra pleural. Com esse modelo, obtivemos maior concentração de doença pleural, possibilitando sua mensuração e grande diferença de volume de doença entre os grupos (3º e 7º dia de injeção). Além disso, os camundongos tiveram sobrevida o suficiente para surgimento de fibrose macroscópica, tornando-os assim, o modelo ideal para nosso estudo.

ANEXO2 – Gráficos

Gráfico 1. Comparação do total de células do líquido pleural do líquido pleural entre a pleurodese precoce (3 dias após injeção pleural) e pleurodese tardia (7 dias após injeção pleural) dentro de cada grupo (Câncer e Salina) e entre os grupos (Câncer e Salina) dentro de cada tempo de 3 dias (pleurodese precoce) e 7 dias (pleurodese tardia) de injeção pleural.

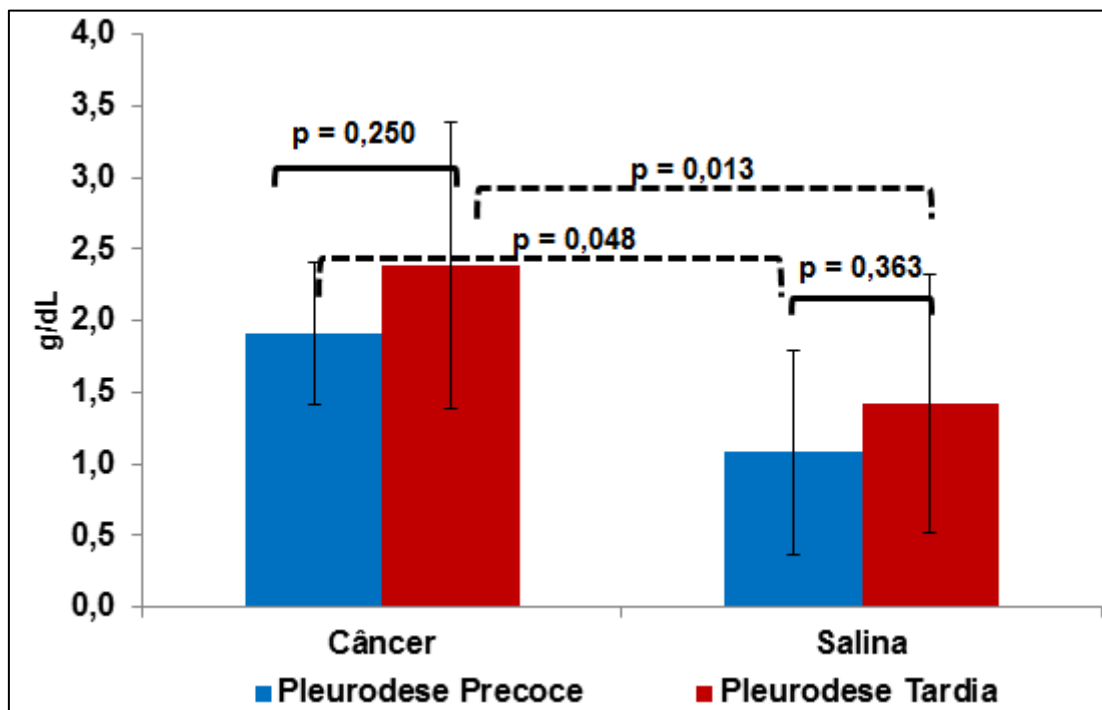


Gráfico 2. Comparação do total de linfócitos do líquido pleural entre a pleurodese precoce (3 dias após injeção pleural) e pleurodese tardia (7 dias após injeção pleural) dentro de cada grupo (Câncer e Salina) e entre os grupos (Câncer e Salina) dentro de cada tempo de 3 dias (pleurodese precoce) e 7 dias (pleurodese tardia) de injeção pleural.

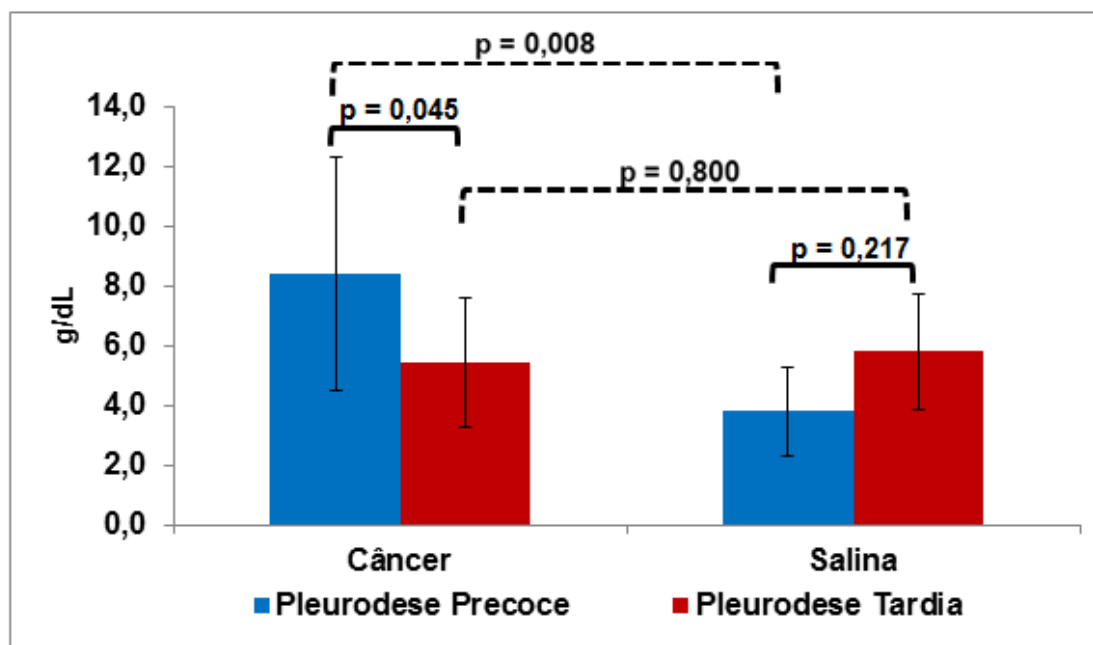


Gráfico 3. Comparação da variação do hematócrito entre a pleurodese precoce (3 dias após injeção pleural) e pleurodese tardia (7 dias após injeção pleural) dentro de cada grupo (Câncer e Salina) e dentro de cada tempo de 3 dias (pleurodese precoce) e 7 dias (pleurodese tardia) de injeção pleural.

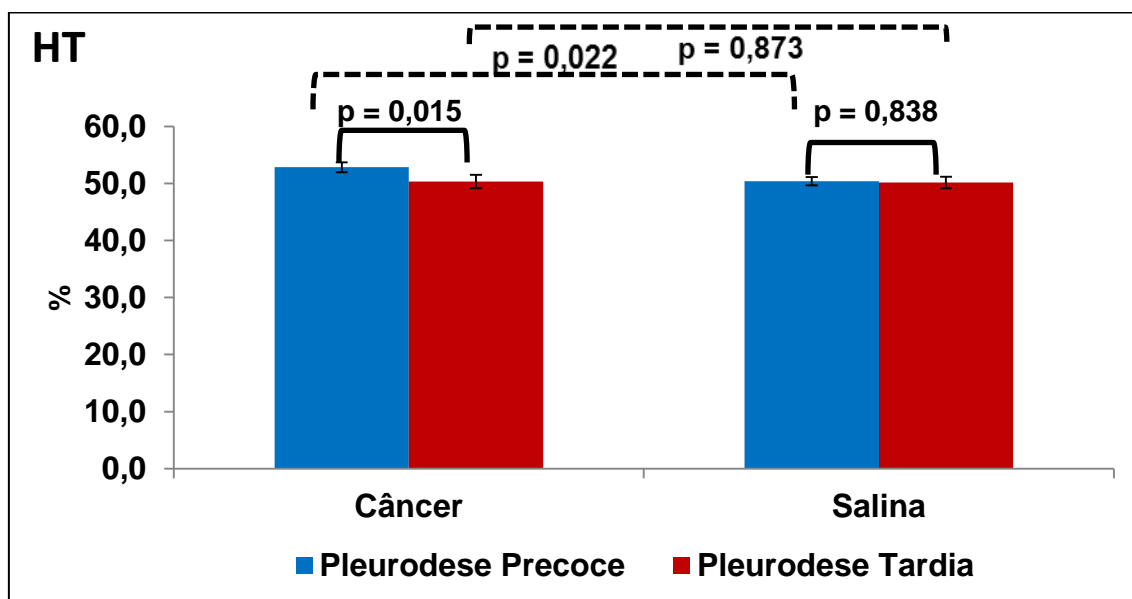


Gráfico 4. Comparação da variação da hemoglobina entre a pleurodese precoce (3 dias após injeção pleural) e pleurodese tardia (7 dias após injeção pleural) dentro de cada grupo (Câncer e Salina) e entre os grupos (Câncer e Salina) dentro de cada tempo de 3 dias (pleurodese precoce) e 7 dias (pleurodese tardia) de injeção pleural.

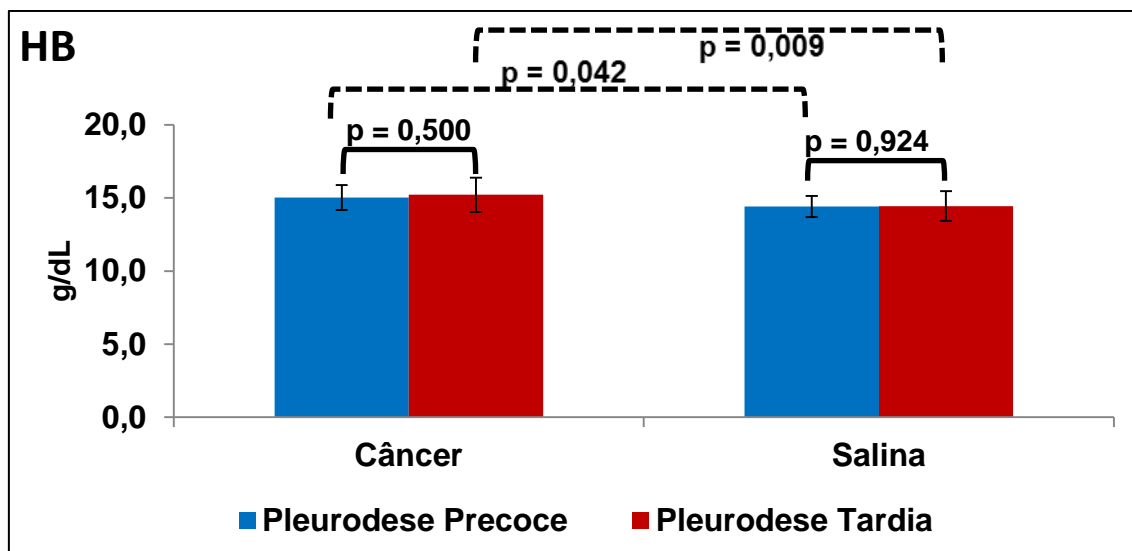
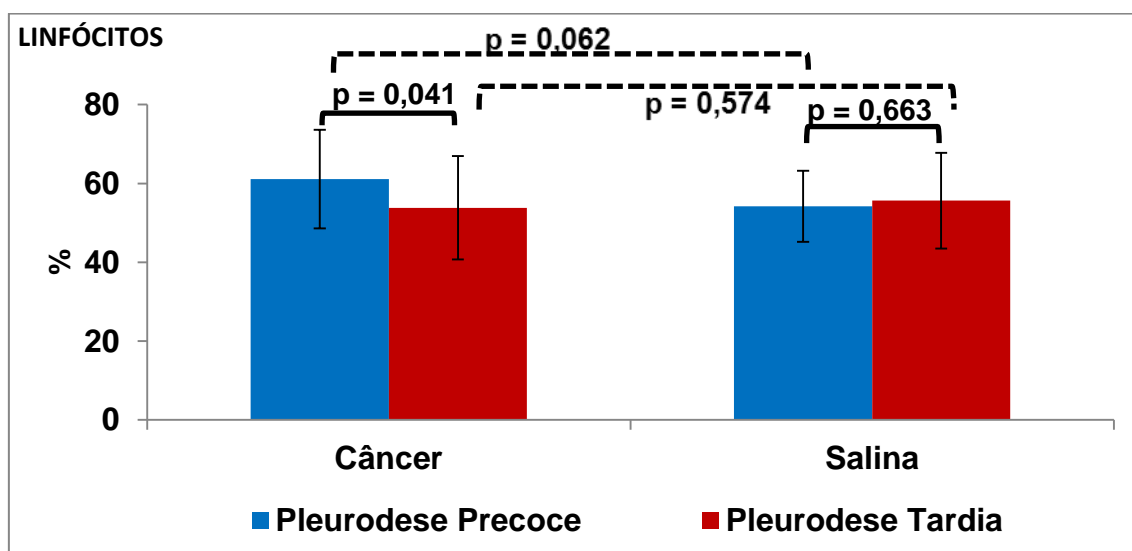


Gráfico 5. Comparação da variação dos linfócitos entre a pleurodese precoce (3 dias após injeção pleural) e pleurodese tardia (7 dias após injeção pleural) dentro de cada grupo (Câncer e Salina) e entre os grupos (Câncer e Salina) dentro de cada tempo de 3 dias (pleurodese precoce) e 7 dias (pleurodese tardia) de injeção pleural.



9 Referências

- 1- Loddenkemper R. Thoracoscopy-state of the art. *Eur Respir J*. 1998;11(1):213–21.
- 2- Herrera Lara S, Fernández-Fabrellas E, Juan Samper G, Marco Buades J, Andreu Lapiedra R, Pinilla Moreno A, et al. Predicting Malignant and Paramalignant Pleural Effusions by Combining Clinical, Radiological and Pleural Fluid Analytical Parameters. *Lung*. 2017;195(5):653-660.
- 3- Sahn SA. Pleural diseases related to metastatic malignancies. *Eur Respir J*. 1997;10(8):1907–13.
- 4- Rodríguez-Panadero F, Borderas Naranjo F, López Mejías J. Pleural metastatic tumours and effusions. Frequency and pathogenic mechanisms in a post-mortem series. *Eur Respir J*. 1989;2(4):366-9. 5
- 5- Antunes G, Neville E, Duffy J, Ali N; Pleural Diseases Group, Standards of Care Committee, British Thoracic Society. BTS guidelines for the management of malignant pleural effusions. *Thorax*. 2003;58 Suppl 2:ii29-38
- 6- Terra RM, Teixeira LR, Vargas FS, Pêgo-Fernandes PM, Jatene FB. Is full postpleurodesis lung expansion a determinant of a successful outcome after talc pleurodesis?. *Chest*. 2009;136(2):361-368.
- 7- Marchi E, Vargas FS, Acencio MMP, Teixeira LR, Antonangelo L, LEE YC, Light RW. Pleurodesis: A novel experimental model. *Respirology*. 2007; 12: 500-504
- 8- Bielsa S, Hernandez P, Rodriguez-Panadero F, Taberner T, Salud A, Porcel JM: Tumor type influences the effectiveness of pleurodesis in malignant effusions. *Lung* 2011; 189:151-155.
- 9- Bethune N. Pleural poudrage: new technique for deliberate production of pleural adhesions as preliminary to lobectomy. *J Thoracic Cardiovasc Surg* 1935;4:251-61.
- 10- Morisaki T, Katano M, Ikubo A, Anan K, Nakamura M, Nakamura K, Sato H, Tanaka M, and Torisu M: Imunosuppressive Citokines (IL-10, TGF- β)

genes expression in human gastric carcinoma tissues. *J Surg Oncol.* 1996; 63: 234-239.

11- Vaz MC, Marchi E Vargas FS. Pleurodese: técnica e indicações. *J Bras Pneumol* 2006;32(4):347-56.

12- Marchi E, Vargas FS, Teixeira LR, Acencio MMP, Antonangelo L, Light R. Intrapleural low-dose silver nitrate elicits more pleural inflammation and less systemic inflammation than low-dose talc. *Chest* 2005;128:1798-804.

13- Chibante MAS, Vaz MC, Vargas FS. IL-6 anti-inflammatory activity in pleural effusion post-coronary artery by-pass graft surgery. *Rev Port Pneumol* 2007; XIII (3): 319-334.

14- Shirakabe A, Hata N, Yokoyama S, Shinada T, Suzuki Y, Kobayashi N, Kikuchi A, Takano T and Mizuno K. Cytokines levels in pleural effusions of patients under intensive care. *J Nippon Med Sch* 2008; 75: 262-268.

15- Ceyhan B, Ozgun S, Çelikel T, Yalçın M, Koç M. IL-8 in pleural effusion. *Respir Med* 1996;90:215-21.

16- Genofre EH, Vargas FS, Antonangelo L, Teixeira LR, Marchi E, Capellozzi V. Ultrastructural acute features of active remodeling after chemical pleurodesis induced by silver nitrate or talc. *Lung* 2005;183:197-207.

17- Mutsaers S, Kalomenidis I, Wilson N, Gary Lee YC. Growth factors in pleural fibrosis. *Curr Opin Pulmon Med* 2006;12:251-8.

18- Kalomenidis I, Guo Y, Lane K, Hawthorne M, Light R. Transforming Growth Factor- β 3 induces pleurodesis in rabbits and collagen production of human mesothelial cells. *Chest* 2005;127:1335-40.

19- Ferroni P, Rosa A, Di Franco M, Palmirotta R, Guadagni F, Davì G, et al: Prognostic significance of interleukin-6 measurement in the diagnosis of acute myocardical infarction in emergency department. *Clin Chim Acta* 2007; 381: 151-156.

- 20- Derunner M, Schuiki E, Minder E, et al: Proinflammatory cytokines in acute myocardial infarction with and without cardiogenic shock. *Clin ResCardiol* 2008; 97: 298-305.22
- 21- Yamaguchi T, Kimura H, Yokota S, Yamamoto Y, Hashimoto T, Nakagawa M, et al: Effect of IL-6 elevation in Malignant pleural effusion on Hiperfibrinogenemia in lung cancer patients. *Jpn J Clin Oncol*. 2000; 30(2)53-58.
- 22- Moura HV, Pomerantzeff, Gomes WJ. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. *Ver Bras Cir Cardiovasc*. 2001; 6(4): 378-87.
- 23- MacGowan GA, Mann DL, Kormos RL, Feldman AM, Murali S: Circulating interleukin-6 in severe heart failure. *AM J Cardiol*. 1997; 79: 1128-1131.
- 24- Kotyza J, Pesek M, Puzman P, Havel D. Progelatinase B/Matrix metalloproteinase-9 proenzyme as a marker of pleural inflammation. *Exp Lung Res*. 2004;30(4):297-309.
- 25- Shimokata K, Saka H, Murate T, Hasegawa Y, Hasegawa T: Cytokine content in pleural effusion. Comparison between tuberculous and carcinomatous pleurisy. *Chest*. 1991; 99: 1103-1107.
- 26- Diao H, Konakawa M: Endogenous interleukin-6 plays a crucial protective role in streptococcal toxic shock syndrome via suppression of tumor necrosis factor alpha production. *Infect Immun*. 2005; 73: 3745-3748.
- 27- Park YP e cols: Immune response after systematic lymph node dissection in lung cancer surgery: changes of interleukin-6 level in serum, pleural lavage fluid, and lung supernatant in a dog model. *World Journal of Surgical Oncology*. 2013;11:270.
- 28- Nishimoto N, Yoshizaki K, Tagoshi H, Monden M, Kishimoto S, Hirano T, Kishimoto T. Elevation of sérum interleukin 6 prior to acute phase proteins on

the inflammation by surgical operation. *Clin Immunol Immunopathol.* 1989; 50: 339-401.

29- Gary Lee YC. Cytokines in pleural diseases. In Light RW, Lee YC: *Textbook of pleural diseases*. London: Arnold Publishers; 2003. P. 63-89.

30- Yano S, Shinohara H, Herbst RS, Kuniyasu H, Bucana CD, Ellis LM, et al. Production of experimental Malignant Pleural Effusions Is Dependent on Invasion of the Pleura and Expression of Vascular Endothelial Growth Factor/Vascular Permeability Factor by Human Lung Cancer Cells. *Am J Pathol.* 2000;157(6):1893-903.

31- Roberts WG, Palade GE. Increased microvascular permeability and endothelial fenestration induced by vascular endothelial growth factor. *J Cell Sci* 1995;108:2369-79.

32- Stearns ME, Garcia FU, Fudge K, Rhim J, Wang M. Role of interleukin 10 and transforming growth factor beta 1 in the angiogenesis and metastasis of human prostate primary tumor lines from orthotopic implants in severe combined immunodeficiency mice. *Clin Cancer Res.* 1999;5(3):711-20.

33- Mohammed KA, Nasreen N, Hardwick J, Logie CS, Patterson CE, Antony VB. Bacterial induction of pleural monolayer barrier dysfunction. *Am J Physiol Lung Cell Moll Physiol* 2001;281:119-25.

34- Bellone G, Smirne C, Mauri FA, Tonel E, Carbone A, Buffolino A, Dughera L, Robecchi A, Pirisi M and Emanuelli G: Cytokine expression profile in human pancreatic carcinoma cells and surgical specimens: implication for survival. *Cancer Immunol Immunother* 2006; 55: 648-698.

35- Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006 ;6(10):715-27.

36- Gajewski TF, Meng Y, Harlin H. Immune suppression in the tumor microenvironment. *J Immunother.* 2006;29(3):233-40.

37- Ferrara N, Alitalo K. Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat Med* 5: 1359-1364, 1999.

- 38- Linderholm B, Grankvist K, Wilking N, Johansson M, Tavelin B, Henriksson R Correlation of vascular endothelial growth factor content with recurrences, survival, and first relapse site in primary node-positive breast carcinoma after adjuvant treatment. *J Clin Oncol*. 2000; 18: 1423-1431.
- 39- Genofre EH, Marchi E, Vargas FS. Inflammation and clinical repercussions of pleurodesis induced by intrapleural talc administration. *Clinics* 2007; 62(5): 627-34.
- 40- Lott JA, Nemensanszky E. Lott JA, Wolf PL. Lactate dehydrogenase. *Clinical Enzymology, a Case Oriented Approach*. New York:Year Book Medical; 1987. 213–44.
- 41- Swan F Jr, Velasquez WS, Tucker S, Redman JR, Rodriguez MA, McLaughlin P , et al. A new serologic staging system for large cell lymphomas based on initial (2-microglobulin and lactate dehydrogenase levels. *J Clin Oncol* 1989;7:1518–27.
- 42- Terpos E, Katodritou E, Roussou M, Pouli A, Michalis E, Delimpasi S, et al. High serum lactate dehydrogenase adds prognostic value to the international myeloma staging system even in the era of novel agents. *Eur J Haematol* 2010;85:114–9.
- 43- Verma A, Abisheganaden J, Light RW. Identifying malignant pleural effusion by a cancer ratio (serum LDH: pleural fluid ADA ratio). *Lung* 2016;194:147–53.
- 44- Verma A, Phua CK, Sim WY, Algozo RE, Tee KS, Lew SJ, Lim AY, Goh SK, Tai DY, Kor AC, Ho B, Abisheganaden J. Pleural LDH as a prognostic marker in adenocarcinoma lung with malignant pleural effusion. *Medicine (Baltimore)*. 2016 Jun;95(26):e3996.
- 45- Clive AO, Kahan BC, Hooper CE, Bhatnagar R, Morley AJ, Zahan-Evans N, et al. Predicting survival in malignant pleural effusion: development and validation of the LENT prognostic score. *Thorax*. 2014;69:1098–104.

-
- 46- Mishra E, Davies H, Wringtson J, Stanton A, Guhan A, Davies C et al. The second therapeutic intervention in malignant effusion trial (TIME2): A randomised controlled trial to assess the efficacy and safety of patient controlled malignant pleural effusion drainage by indwelling pleural catheter compared to chest drain and talc slurry pleurodesis. *Eur Resp Journal* 2012; 40: 3074.
- 47- Van der Heuvel MM, Smith HJ, Barbierato SB, Havenith CE, Beelen RH, Postmus PE. Talc-induced inflammation in the pleural cavity. *Eur Resp J.* 1998;12:1419-23.
- 48- Montes JF, Ferrer J, Villarino MA, Baeza B, Crespo M, Garcia-Valero J. Influence of talc dose on extrapleural talc dissemination after talc pleurodesis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2003;168:348-55.
- 49- Ferrer J, Montes JF, Villarino MA, Light RW, Garcia-Valero J. Influence of particle size on extrapleural talc dissemination after talc slurry pleurodesis. *Chest.* 2002;122:1018-27
- 50- Werebe EC, Pazetti R, de Campos JR, Fernandez PP, Capelozzi VL, Jatene FB, et al. Systemic distribution of talc after intrapleural administration in rats. *Chest.* 1999;115:190-3.
- 51- Fraticelli A, Robaglia A, Gimenez C, Cau P, Monjanel-Mouterde S, Astoul P. An experimental study on the systemic distribution of calibrated talc after intra-pleural injection. *Rev Mal Respir.* 2003;20(6 Pt 1):881-8.
- 52- Maskell NA, Lee YC, Gleeson FV, Hedley EL, Pengelly G, Davies RJ. Randomized trials describing lung inflammation after pleurodesis with talc of varying particle size. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004;170:377-82.
- 53- Froudarakis ME, Klimathianaki M, Pougonias M. Systemic inflammatory reaction after thoracoscopic talc poudrage. *Chest.* 2006;129:356-61.
- 54- Stathopoulos GT, Kalomenidis I. Animal models of malignant pleural effusion. *Curr Opin Pulm Med.* 2009;15(4):343-52.

- 55- Stathopoulos GT, Lee TCG. Experimental models: pleural disease other than mesothelioma. *Textbook of pleural diseases*, 2nd ed. London, UK: Hodder and Arnold; 2008. Pp. 169-186.
- 56- Teixeira LR, Vargas FS, Antonangelo L, Mattos VC, Vaz MA, et al. Low concentration silver nitrate pleurodesis in rabbits: optimal concentration for rapid and complete sclerosing effect. *Lung*. 2003; 181:353–9.
- 57- Genofre EH, Vargas FS, Antonangelo L, Teixeira LR, Marchi E, Capellozzi V. Ultrastructural acute features of active remodeling after chemical pleurodesis induced by silver nitrate or talc. *Lung* 2005;183:197-207.
- 58- Stathopoulos GT, Zhu Z, Everhart MB, Kalomenidis I, Lawson WE, Bilaceroglu S, et al. Nuclear factor-kappaB affects tumor progression in a mouse model of malignant pleural effusion. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006; 34: 142-150.
- 59- Stathopoulos GT, Kollintza A, Moschos C, Psallidas I, Sherrill TP, Pitsinos EN,, et al. Tumor necrosis factor- α promotes malignant pleural effusion. *Cancer Res* 2007; 67:9825-9834.
- 60- Rigamonti E, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Regulation of macrophage functions by PPAR- α PPAR- γ , and LXRs in mice and men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; 28: 1050-1059.
- 61- COPE, Cytokines and Cells Online Pathfinder Encyclopaedia, Version 19.4 (April 2007): Cytokine Inter-species.
- 62- Marchi E, Vargas FS, Acencio MMP, Teixeira LR, Antonangelo L, LEE YC, Light RW. Pleurodesis: A novel experimental model. *Respirology* 2007; 12: 500-504.
- 63- Ferreiro L, Toubes ME, Valdes L. Contribution of pleural fluid analysis to the diagnosis of pleural effusion. *Med Clin (Barc)*. 2015;145(4):171-7.
- 64- Zebrowski, B. K., Liu, W., Ramirez, K., Akagi, Y., Mills, G. B., and Ellis, L. M. Markedly elevated levels of vascular endothelial growth factor in malignant ascites. *Ann. Surg. Oncol*. 1999;6:373–378.

-
- 65- Zebrowski BK, Yano S, Liu W, Shaheen RM, Hicklin DJ, Putnam JB Jr, et al. Vascular endothelial growth factor level and induction of permeability in malignant pleural effusions. *Clin Cancer Res*. 1999;5(11):3364-8.
- 66- Rodriguez-Panadero F, Worboys AM. Mechanism of pleurodesis. *Respiration* 2012; 83:91-98
- 67 - Sahn SA, Good JT Jr: Pleural fluid pH in malignant effusions: diagnostic, prognostic and therapeutic implications. *Ann Intern Med* 1988; 108: 345–349.
- 68 - Martinez-Moragon E, Aparicio J, Sanchis J, Menendez R, Cruz Rogado M, Sanchis F: Malignant pleural effusion: prognostic factors for survival and response to chemical pleurodesis in a series of 120 cases. *Respiration* 1998; 65: 108–113.
- 69 - Hartman DL, Antony VB, Hott JW, Godbey SW, Yu L, Rodriguez Panadero F: Thoracoscopic talc insufflation increases pleural fluid IL-8 levels in patients with malignant pleural effusions. *Am J Respir Crit Care Med* 1994; 149(suppl 2):A974.
- 70- Jantz MA, Antony VB: Pathophysiology of the pleura. *Respiration* 2008; 75: 121–133.
- 71- Genofre EH, Marchi E, Vargas F.S.. Inflammation and clinical repercussions of pleurodesis induced by intrapleural talc administration. *CLINICS* 2007;62(5):627-34
72. Genofre EH, Vargas FS, Teixeira LR, Acencio MMP, Antonangelo L, Marchi E. Systemic inflammatory acute response in talc pleurodesis using talc of different size particles. *Chest*. 2004;126:726S.
73. Genofre EH, Vargas FS, Acencio MMP, Antonangelo L, Teixeira LR, Figueiredo VR, et al. Talc pleurodesis: lung dispersion of talc using talc of different size particles. *Eur Respir J*. 2006;28:740s.
- 74- Swan F, Velasquez WS, Tucker S, et al. A new serologic staging system for large cell lymphomas based on initial (2-microglobulin and lactate dehydrogenase levels. *J Clin Oncol* 1989;7:1518–27.