

JULIO CEZAR MENDES BRANDÃO

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES INFLAMATÓRIAS E
MORFOLÓGICAS PULMONARES EM MODELO ANIMAL DE
PNEUMOPERITÔNIO.**

**Tese apresentada à
Universidade Federal de
São Paulo para obtenção
do título de Doutor em
Ciências.**

São Paulo

2017

JULIO CEZAR MENDES BRANDÃO

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES FUNCIONAIS E MORFOLÓGICAS
PULMONARES EM MODELO ANIMAL DE PNEUMOPERITÔNIO.**

**Tese apresentada à
Universidade Federal de São
Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências**

**Orientador: Prof. Dr. Itamar
Souza de Oliveira Junior**

**São Paulo
2017**

Brandão, Julio Cezar Mendes

Estudo das alterações funcionais e morfológicas pulmonares em modelo animal de pneumoperitônio. Julio Brandão. – São Paulo, 2016.

XXVIII, 73

Tese (Doutorado) – Escola Paulista de Medicina - Universidade Federal de São Paulo - Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional.

Título em inglês: Study of lung functional and morphological alterations in animal model of pneumoperitoneum.

1. Pneumoperitônio. 2. Citocinas. 3. Estresse Oxidativo. 4. Lesão Pulmonar. 5. Laparoscopia. 6. Experimental

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DISCIPLINA DE MEDICINA TRANSLACIONAL

Orientador: Prof. Dr. Itamar Souza de Oliveira Junior

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando dos Reis Falcão

Chefe do Departamento de Medicina: Profa. Dra. Maria Teresa Zanella

**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina
Translacional:** Profa. Dra. Dulce Elena Casarini

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA
DISCIPLINA DE MEDICINA TRANSLACIONAL

Orientador: Prof. Dr. Itamar Souza de Oliveira Junior

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando dos Reis Falcão

Chefe do Departamento de Medicina: Profa. Dra. Maria Teresa Zanella

**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina
Translacional:** Profa. Dra. Dulce Elena Casarini

DEDICATÓRIA

A Deus,

Pelo milagre de vida, pelo amor e pelas bênçãos sem fim em minha vida.

Aos meus pais, João e Bete,

Por acreditarem em mim, pelo cuidado, carinho e dedicação que sempre tiveram. Por me amarem e demonstrarem o amor e os caminhos corretos para tornar-me um cidadão de bem.

À minha esposa, Denise

Por aceitar os meus sonhos, por torná-los seus sonhos também. Pelo caminho percorrido juntos. Por confiar em mim e dividir a sua história. Por ter me dado o nosso filho Daniel, uma grande benção.

Ao meu filho, Daniel

Por existir, por ter vindo como um presente de Deus para implementar os meus sentimentos e o meu conceito de amor.

À minha querida irmã, Ane

Pela grande amizade, pelo amor, pelo respeito e pela parceria.

Aos meus amigos,

Por andarem comigo, pela atenção e consideração na alegria e na tristeza.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Itamar Souza de Oliveira Junior

Por ter me acolhido mesmo sem me conhecer direito, por ter confiado em mim e por ter segurado na minha mão para me ensinar muita coisa. Pela paciência diante da minha ignorância e por me ensinar como buscar o conhecimento que deveria adquirir nesta parte da minha formação. Pela humildade e pela demonstração de que um orientador pode ser teu amigo.

A todos os animais,

Por serem instrumentos compulsoriamente utilizados como fonte de aprendizado para poder aliviar a dor dos nossos semelhantes.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Itamar Souza de Oliveira Junior, Orientador do Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional e Professor-Visitante da Disciplina de Anestesiologia, Dor e Medicina Intensiva da Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina (UNIFESP – EPM), meu orientador, por ter me aceitado como aluno, pelo modo como me acolheu, por entender as minhas particularidades e a distância geográfica. Por me ensinar os caminhos para me enveredar na pesquisa e na ciência, amenizando as dificuldades, sempre com bom humor, boa vontade, otimismo, dedicação, humildade, sapiência, paciência, persistência, obediência aos princípios da ética e amor pelo que faz.

Ao Prof. Dr. Luiz Fernando dos Reis Falcão, Professor-adjunto da Disciplina de Anestesiologia, Dor e Medicina Intensiva da Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina (UNIFESP – EPM), com quem aprendi muito, pela confiança, pela parceria, pelo exemplo e pela dedicação.

À Profa. Dra. Dulce Elena Casarini, Professora Livre Docente e Afiliada da Disciplina de Nefrologia e Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional da Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina (UNIFESP – EPM), pela calorosa acolhida no Programa de Pós-Graduação em Medicina Translacional, estímulo ao trabalho científico, atenção, sempre disposta a sanar as dúvidas e resolver problemas.

Ao Prof. Dr. Marcos Antonio Costa de Albuquerque, chefe do Serviço de Anestesiologia do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (UFS), por sua exemplar dedicação integral à docência-assistência; pela recepção na UFS e por confiar a mim os seus residentes e alunos.

Às Biomédicas, Vanessa Coelho Gaspar do Departamento de Cirurgia e *Kátia de Vasconcelos* do Departamento de Morfologia e Genética e a Enfermeira *Carla Andréia Dato* do Departamento de Cirurgia da Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina (UNIFESP – EPM), meu agradecimento pelo grande apoio, trabalho conjunto e pelas análises histopatológicas.

À Disciplina de Anestesiologia, Dor e Terapia Intensiva da Universidade Federal de São Paulo-Escola Paulista de Medicina (UNIFESP – EPM), por ter me recebido de braços abertos desde a residência médica, depois no doutorado, onde pude aprender os primeiros passos da anestesiologia, profissão que tanto amo, tendo me orientado nos preceitos éticos e voltados para a melhor assistência aos nossos pacientes, sendo um exemplo de serviço de anestesiologia para todo o país, principalmente nos nomes dos Profs. Maria Angela Tardelli, Massashi Munechica, David Ferez e Américo Massafuni (*in memorian*).

À Sociedade de Anestesiologia de Sergipe (SAESE) e Coopanest-SE, pela confiança e por acreditarem em mim.

Aos membros do Biotério Saul Goldenberg da Universidade Federal de São Paulo pelos cuidados com os animais, pela presteza, agilidade e disposição em nos ajudar no fornecimento de animais para a realização dos nossos experimentos.

Minha sincera gratidão a todos, sem os quais, esse trabalho não se tornaria realidade.

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES** (Julio Brandão) e da **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP** (Itamar Souza) pelo auxílio para esta pesquisa aprovado em 2014.

“Consagre ao Senhor tudo o que você faz, e os seus planos serão bem-sucedidos” Livro de Provérbios 16:3

RESUMO

Cirurgias minimamente invasivas, como a laparoscopia, causam pequenos traumas e atenuam a resposta endócrino metabólica ao estresse causado pela cirurgia. O estresse oxidativo é também uma parte integrante da resposta ao ato cirúrgico. Contudo, o pneumoperitônio continua ainda sendo implicado na produção de radicais livres. **Objetivo:** Avaliação dos efeitos do pneumoperitônio nos pulmões de ratos submetidos à insuflação abdominal por dióxido de carbono (simulando laparoscopia). **Material e Métodos:** Foram utilizados seis grupos (n=8 ratos por grupo), sendo: **Sham:** sem insuflação intra-abdominal; **IAP5:** uso de pressão intra-abdominal de 5 mmHg de dióxido de carbono; **IAP8:** uso de pressão intra-abdominal de 8 mmHg; **IAP10:** uso de pressão intra-abdominal de 10 mmHg; **IAP12:** uso de pressão intra-abdominal de 12 mmHg; **IAP14:** uso de pressão intra-abdominal de 14 mmHg. Ao final do experimento foi realizada a eutanásia e retirados os pulmões para análise de estresse oxidativo, mediadores inflamatórios e histologia.

Resultados: O grupo Sham difere estaticamente dos outros grupos em todas as análises. TNF-alfa: IAP8 (5,73 pg/mL) foi menor quando comparado com o IAP12 (6,32 pg/mL) e IAP14 (7,56 pg/mL) ($p < 0,001$). IAP12 foi menor quando comparado com IAP14 ($p < 0,001$). IL-6: IAP8 (8,23 pg/mL) foi menor em comparação com os IAP10 (8,91 pg/mL) ($p < 0,05$). Os IAP10 foram inferiores a IAP12 (9,74 pg/mL) ($p < 0,01$) e a IAP14 (14,57 pg/mL) ($p < 0,001$). IAP12 foi

menor quando comparado com IAP14 ($p < 0,001$). Peroxidação lipídica: IAP8 foi menor quando comparado com os IAP10 ($p < 0,001$) e este foi menor quando comparado com os IAP12 ($p < 0,01$). IAP12 foi menor quando comparado com IAP14 ($p < 0,001$). MPO: IAP8 (8,23 mU/mL) foi menor quando comparado com os IAP10 (8,91 mU/mL) ($p < 0,05$). Os IAP10 foram menores quando comparados com IAP12 (9,74) ($p < 0,01$), e foi menor IAP12 quando comparados com IAP14 (14,57 mU/mL) ($p < 0,001$). Os IAP5 não tiveram diferenças estatisticamente significativas para o grupo sham na maior parte dos itens avaliados. Histologia: As amostras de tecidos pulmonares de ratos IAP5 e IAP8 apresentaram danos leves, os grupos IAP10 e IAP12 danos moderados e o grupo IPA14 danos graves.

Conclusões: Estes dados demonstram crescentes alterações inflamatórias e histológicas diretamente proporcionais ao aumento do IAP. A análise bioquímica e inflamatória demonstrou aumento dos marcadores nos grupos com pressão mais elevada. Esses achados sugerem que a IAP mais baixa protege contra lesões após a insuflação do pneumoperitônio.

Palavras-chaves: Pneumoperitônio; Experimental; Citocinas; Estresse oxidativo; Lesão pulmonar, Laparoscopia.

ABSTRACT:

Study of functional and morphological pulmonary alterations in an animal model of pneumoperiton.

Background: Laparoscopic surgeries require pneumoperitoneum achieved by pressure-controlled insufflation of carbon dioxide into peritoneal cavity. This can change the respiratory mechanics and promotes an oxidative stress. We aimed to assess the effect of different intra-abdominal pressures (IAP) from the pneumoperitoneum in a ventilated rat model with normal lungs.

Methods: The animals (n=48) were allocated randomly into 6 groups: Sham group, group without pneumoperitoneum; IAP5 mmHg; IAP8 mmHg; IAP10 mmHg; IAP12 mmHg and IAP14 mmHg. All animals were ventilated during 60 minutes with VT 5 mL/kg, PEEP 2 cmH₂O, FiO₂ 35% and RR 60-70 bpm. At the end of the experiment the animals were euthanatized and the lungs were removed for analysis. We performed lipid peroxidation, myeloperoxidase activity, cytokines measurements, and histopathologic analysis.

Results: The Sham group was lower when compared with other groups in all analysis. TNF-alpha: IAP8 (5.73 pg/mL) was lower when compared with IAP12 (6.32 pg/mL) and IAP14 (7.56 pg/mL) (p<0.001). IAP 12 was lower when compared to IAP14 (p<0.001). IL-6: IAP8 (8.23 pg/mL) was lower

when compared to IAP10 (8.91 pg/mL) ($p<0.05$). IAP10 was lower when compared to IAP12 (9.74 pg/mL) ($p<0.01$) and to IAP14 (14.57 pg/mL) ($p<0.001$). IAP12 was lower when compared to IAP14 ($p<0.001$). Lipid peroxidation: IAP8 was lower when compared to IAP10 ($p<0.001$), IAP10 was lower when compared to IAP12 ($p<0.01$). IAP12 was lower when compared to IAP14 ($p<0.001$). MPO activity: IAP8 (8.23 mU/mL) was lower when compared to IAP10 (8.91 mU/mL) ($p<0.05$). IAP10 was lower when compared to IAP12 (9.74 mU/mL) ($p<0.01$), and IAP12 was lower when compared to IAP14 (14.57 mU/mL) ($p<0.001$). Histological: The tissues from IAP8 rats exhibited low architecture alveolar damage, augment of alveolar septae and neutrophil infiltration, whereas IAP10 and IAP12 groups exhibited alteration in architecture alveolar with septal rupture edema and neutrophil infiltration and the IPA14 exhibited severe septal rupture, edema, diffuse bleeding and neutrophil infiltration. Conclusions: These data demonstrated histological growing changes according to the increase of the intraperitoneal pressure. The biochemical and inflammatory analysis demonstrated increase in the groups with higher pressure. Those findings suggest that the lower pressure protects the lungs from injury after pneumoperitoneum.

Keywords: Experimental; Pneumoperitoneum; Cytokines; Oxidative stress; Lung Injury, Laparoscopy.

Listas de Figuras:

Figura 1 Fluxograma.....	15
Figura 2 Demonstra o posicionamento do animal em posição supina e da cânulaorotraqueal.....	17
Figura 3 Demonstra a depilação da região abdominal com utilização de creme depilatório.....	18
Figura 4 Demonstra o posicionamento e fixação da cânula para insuflação do abdome por dióxido de carbono(CO ₂)	18
Figura 5 Animal anestesiado com pneumoperitônio insuflado.....	20
Figura 6 Análise de MDA comparações entre o grupo Sham e os demais grupos experimentais.....	30
Figura 7 Análise de MPO comparações entre o grupo Sham e os demais grupos experimentais.....	32
Figura 8 Análise de TNF alfa comparações entre o grupo Sham e os demais grupos experimentais.....	34
Figura 9 Análise de IL-1 comparações entre o grupo Sham e os demais grupos experimentais.....	35
Figura 10 Análise de IL-6 comparações entre o grupo Sham e os demais grupos experimentais.....	37
Figura 11 Análise de SOD1 comparações entre o grupo Sham e os demais grupos experimentais.....	38

Figura 12 Análise de SOD2 comparações entre o grupo Sham e os demais grupos experimentais.....	39
Figura 13 Análise de SOD3 comparações entre o grupo Sham e os demais grupos experimentais.....	39
Figura 14 Avaliação histológica das amostras de tecido pulmonar mostrando as diferenças entre os grupos estudados.....	42
Figura 15 Histograma mostrando a distribuição do escore de lesão pulmonar nas amostras selecionadas dos diferentes grupos.....	43

Lista de quadros e tabelas:

Quadro 1 Contraindicações da cirurgia laparoscópica.....	3
Quadro 2 Alterações fisiológicas relacionadas ao pneumoperitônio.....	5
Tabela 1 Descrição das médias e dos parâmetros para a média em amostras para o experimento MDA.....	29
Tabela 2 Descrição das médias e dos parâmetros para a média em amostras para o experimento MPO.....	31
Tabela 3 Descrição das médias e dos parâmetros para a média em amostras para o experimento TNF-alfa.....	33
Tabela 4 Descrição das médias e dos parâmetros para a média em amostras para o experimento IL-1beta.....	35
Tabela 5 Descrição das médias e dos parâmetros para a média em amostras para o experimento IL-6.....	36
Tabela 6 Descrição dos genes estudados e o valor da expressão gênica encontrado no pool de amostras de cada grupo.....	38

Lista de Abreviaturas:

CO ₂	Dióxido de carbono
Cu ⁺² /Zn ⁺²	Cobre e Zinco
cmH ₂ O	Centímetro de água
cDNA.....	DNA complementar
°C	Graus Celsius
DC	Débito Cardíaco
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
ELISA.....	Ensaio de imunoabsorção enzimática
ERO.....	Espécies reativas de oxigênio
FiO ₂	Fração Inspirada de Oxigênio
Fr	Frequência respiratória
G	Gauge
HAS.....	Hipertensão Arterial Sistêmica
HE	Hematoxilina-Eosina
IR	Isquemia e Reperfusão
IM	Intra-muscular
IV	Intravenosa
IAP	Pressão intra-abdominal
ipm	Incursões por minuto
IC	Intervalo de confiança
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IC95%.....	Intervalo de confiança 95%
Mn ⁺⁴	Manganês
MPO	Mieloperoxidase
MDA.....	Dialdeído malônico ou malondialdeído ou propanodial
mg/kg.....	Miligrama por quilograma
mL/kg	Mililitro por quilograma
mmHg	Milímetro de mercúrio
mU/mL.....	Miliunidades por mililitro

min	Minuto
M±DP	Média e desvio padrão
µm	Micrometro
nm	Nanômetro
NO.....	Óxido Nítrico
O ₂	Molécula de Oxigênio
O ₂ ⁻	Radical Superóxido
OH ⁻	Radical Hidroxila
PBS	Solução tampão fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMN	leucócitos polimorfonucleares
PPCs	PCR positivos replicados
PNP	Pneumoperitônio
pg/mL	Picogramas por mililitro
Ptp.....	Pressão transpulmonar
PAD.....	Pressão arterial diastólica
PAS	Pressão arterial sistólica
PEEP	Pressão positiva ao final da expiração
pg/mL	Picograma/mililitro
PGE1 e PGE2	Prostaglandinas 1 e 2
pmol/mg.....	Picomol/miligramma
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RTCs	Controles de transcrição reversa
RLO.....	Radicais livres de oxigênio
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase-transcriptase reversa
®	Registrado
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SS.....	Solução salina
SOD.....	Superóxido dismutase
TNF-alfa	Fator de necrose tumoral-alfa
TIE	Tomografia de impedância elétrica
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico

VT Volume corrente
VM Ventilação mecânica
X Vezes
XD.....Xantina desidrogenase
XO..... Xantina oxidase

Lista de Siglas

CEDEME-EPM/UNIFESP.....Centro de
Desenvolvimento de Modelos Experimentais para Medicina e Biologia da
Escola Paulista de Medicina Universidade Federal de São Paulo

CEUA.....Comissão de Ética no
Uso De Animais

SUMÁRIO

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Resumo	x
Abstract	xii
Listas	xv
Lista de Figuras	xv
Lista de Tabelas.....	xvii
Lista de Abreviaturas	xviii
Lista de Siglas	xxi
SUMÁRIO.....	xxii
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	7
3. OBJETIVO.....	11
3.1 Objetivo.....	12
3.1.1 Objetivos secundários.....	12
3.2 Hipótese	12
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.- Material e Métodos	14
4.1.- Delineamento Experimental	14
4.1.1. Grupos e Procedimento Experimental.....	14
4.1.2. Fluxograma.....	15
4.1.2. Quantificação da Peroxidação Lipídica(MDA)	21

4.1.5. Avaliação da Atividade da Mieloperoxidase (MPO).....	22
4.1.6. Avaliação de Mediadores Pró-Inflamatórios por Ensaio Imunoenzimático (ELISA).....	22
4.1.7. Avaliação dos Antioxidantes por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR).....	22
4.1.7.1. Preparação do RNA e quantificação por RT-PCR em tempo- real.....	22
4.1.9. Análise Histológica.....	24
4.2. Análise Estatística.....	26
5. RESULTADOS.....	29
6. DISCUSSÃO.....	44
6.1 Limitações do Estudo.....	53
7. CONCLUSÃO.....	55
8. ANEXOS.....	57
9. REFERÊNCIAS.....	59

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

I. INTRODUÇÃO

A cirurgia laparoscópica é uma técnica utilizada no diagnóstico e tratamento em um grande número de especialidades, tais como em cirurgia geral, do aparelho digestivo, oncológica, das articulações (artroscopia) e em ginecologia e urologia ¹⁻⁴.

A laparoscopia é realizada por meio de incisões muito pequenas no abdome nos quais se introduzem o laparoscópio, pinças, insufladores e demais instrumentais através de trocateres. Através de uma câmera de fibra óptica que se permite a realização, por visualização indireta, de procedimentos diagnósticos e terapêuticos⁵⁻⁷.

Os procedimentos de cirurgia laparoscópica são usualmente usados nos casos em que há possibilidade da realização da cirurgia por laparotomia e são específicos para diversos procedimentos cirúrgicos, contudo existem contraindicações (Quadro 1) ⁵⁻¹⁰.

As potenciais vantagens da laparoscopia sobre a laparotomia incluem: o reduzido tempo operatório, pequenas cicatrizes com menores complicações das mesmas, benefício estético, menor tempo de íleo pós-operatório, redução da formação de aderências, menor resposta endócrino-metabólica ao trauma, menores complicações pós-operatórias, menor dor pós-operatória, menor consumo de medicações analgésicas, baixo custo, mobilização precoce,

recuperação mais rápida, alta hospitalar e retorno as atividades laborais precoce^{5-9, 11}.

Quadro 1. Contraindicações da cirurgia laparoscópica^{5-7,9}.

Relativas:	Absolutas:
- Gravidez avançada - Extremos de peso - Múltiplas laparotomias anteriores - Doenças cardiorrespiratórias - Tuberculose peritoneal - Patologia maligna adiantada - Massa abdominal volumosa - Comprometimento do estado geral da paciente.	- Obstrução intestinal - Instabilidade hemodinâmica - Peritonite difusa - Hérnias abdominais e diafragmáticas extensas. - Contra-indicação para anestesia geral

Por outro lado, a cirurgia laparoscópica requer a produção de pneumoperitônio, que se realiza utilizando insuflação por pressão controlada de dióxido de carbono (CO₂) ou outros gases na cavidade peritoneal. O CO₂ é o mais utilizado por ser de baixo custo, absorvível, solúvel, não inflamável e as pressões de insuflação habitualmente utilizadas variaram entre 12-15 milímetros de mercúrio (mmHg; ou 16,31 – 20,39 centímetros de água [cmH₂O])¹². O pneumoperitônio é um evento complexo, contudo bem tolerado, sendo um estado fisiopatológico caracterizado pelo aumento da pressão intra-abdominal (IAP, *intra-abdominal pressure*)¹³⁻¹⁶ caracterizando uma isquemia e

o reestabelecimento do fluxo (reperfusão) que ocorre com a desinsuflação da cavidade abdominal com importantes efeitos hemodinâmicos e respiratórios^{7,11,17,18}.

Esta condição de “isquemia-reperfusão” (IR) é um importante estímulo à produção de estresse oxidativo e alterações respiratórias diretas e secundárias.

A instabilidade hemodinâmica é caracterizada por redução do débito cardíaco (DC) e aumento da pressão arterial sistêmica (PAS), com elevação da resistência vascular pulmonar e periférica. A alteração do débito cardíaco é usualmente inversamente proporcional ao aumento da pressão intra-abdominal¹³, mas isto está bem documentado como alteração transitória, uma vez que não altera durante todo o período de uso do pneumoperitônio^{14,15}. Estas discrepâncias causam diferenças no uso da insuflação com CO₂ na pressão intra-abdominal¹⁶, na perfusão tissular, nos níveis de anestésicos no sítio efetor central (desequilíbrio da histerese), podendo influenciar as técnicas anestésicas utilizadas. Contudo, outros fatores influenciam o débito cardíaco e demais variáveis fisiológicas. Muitos estudos demonstram uma redução entre 10-30% no débito cardíaco durante insuflação peritoneal quando o paciente é posicionado com a cabeça para baixo (posição de Trendelenburg)^{19,20} ou para cima (posição em proclive)^{21,22}.

As principais alterações fisiológicas relacionadas ao pneumoperitônio estão relacionadas abaixo no quadro 2^{12, 23-32}.

Quadro 2. Alterações Fisiológicas relacionadas ao pneumoperitônio:

1. Efeitos Pulmonares
Deslocamento superior do diafragma
Aumenta a liberação de CO ₂ pelo pulmão em até 50% durante o pneumoperitônio em função da absorção peritoneal
Distúrbio Ácido-Base
Risco de acidose: pacientes sépticos, com fluxo sanguíneo regional prejudicado, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) ou com baixo débito cardíaco
Redução do fluxo sanguíneo nos órgãos torácicos
Redução da complacência pulmonar
Aumento na pressão de pico nas vias aéreas
Redução da capacidade vital
Aumento na resistência das vias aéreas
Favorecimento de lesões nos pneumócitos
2. Efeitos Circulatórios
O aumento da pré-carga
Aumento da pós-carga
Aumento do trabalho cardíaco
Risco em pacientes cardiopatas e com insuficiência coronariana
O desempenho cardiovascular não volta ao normal imediatamente após o pneumoperitônio ser desfeito
Embolia gasosa
3. Efeitos Renais
Diminuição do débito urinário
Redução na taxa de filtração glomerular
4. Efeitos sobre a coagulação
Posicionamento do paciente, especialmente a posição de Trendelenburg invertida, diminui o fluxo venoso femoral podendo levar a trombose venosa profunda (TVP)
Retorno mais precoce a plena atividade como fator de proteção contra a TVP

A pressão intra-abdominal durante cirurgia laparoscópica pode causar lesões por isquemia-reperfusão afetando primariamente e posteriormente órgãos e tecidos distantes, sendo que este efeito seria tempo e pressão-dependente^{11,20,33-36}.

REVISÃO DE LITERATURA

II. REVISÃO DA LITERATURA

Os efeitos adversos hemodinâmicos do pneumoperitônio estão confirmados por estudos utilizando cateterização de artéria pulmonar²⁰, impedância elétrica torácica^{20,22}, pressão intra-abdominal avaliada por medida intravesical²³ ecocardiografia transtorácica²⁴ e transesofágico^{25,26,37}.

Algumas das alterações nas propriedades mecânicas do sistema respiratório estão associadas com a compressão exercida na base dos pulmões pelo deslocamento cefálico do diafragma com uma redução da capacidade residual pulmonar funcional, aumento da pressão de pico, da média das pressões nas vias aéreas, além do aumento do risco de pneumotórax³⁸. Por estas razões o pneumoperitônio durante anestesia geral causa a redução contínua da oxigenação arterial com atelectasia compressiva³⁹, particularmente em regiões pulmonares dependentes⁴⁰. O recrutamento corrente cíclico das áreas atelectásicas aumenta o estresse mecânico no parênquima pulmonar⁴¹. Tal estresse diminui o volume pulmonar que pode ser composto por comprometimentos no pré- ou no intra-operatório produzindo disfunção pulmonar pós-operatória. Técnicas não-invasivas incluindo tomografia de impedância elétrica (TIE) e os índices de estresse encontram-se estabelecidos, mas ainda controversos.

A produção, com reduzida degradação, de espécies reativas de oxigênio (ERO) causa lesão tissular oxidativa e também a ativação de

mediadores inflamatórios iniciadas imediatamente após a reperfusão que pode durar algumas horas, fato que em termos de lesão celular podemos chamar de “reversível”, contudo uma segunda fase pode ocorrer por até dias levando a uma lesão “irreversível”⁴²⁻⁴⁶. Para tanto, o organismo produz substâncias antioxidantes, como a superóxido dismutase (SOD), na tentativa de equilibrar o sistema, a SOD1 e SOD3 são dependentes de Cu/Zn, sendo a primeira presente no núcleo e citosol e a outra na matriz extracelular e a SOD2, que é dependente de Mn, presente na mitocôndria⁴⁷.

Corona e colaboradores (2015) estudaram os efeitos do óxido nítrico no pneumoperitônio e suas implicações na adesão pós-operatória em camundongos nos quais demonstraram uma melhora na prevenção do efeito de adesividade (adesinogênico) na cavidade peritoneal⁴⁸.

Outros estudos experimentais demonstraram efeitos bactericidas controversos em animais submetidos à contaminação peritoneal e o uso de CO₂ intraperitoneal^{49,50}.

Para a manutenção da anestesia geral a ventilação mecânica é uma ferramenta muito importante. Contudo, há quase duas décadas sabemos que a ventilação mecânica pode levar a lesão pulmonar. Dreyfuss e colaboradores (1998) demonstraram a relação entre ventilação mecânica e alterações patológicas no tecido pulmonar⁵¹, e recentemente Andrade e colaboradores (2014) demonstraram alterações pulmonares e diafragmáticas em animais senis

submetidos à ventilação mecânica⁵². Tais informações ampliam a importância do estudo do pneumoperitônio, uma vez que duas pressões diferentes, peritoneal e pulmonar, interagem.

OBJETIVOS

III. OBJETIVO

III.1. Objetivo Geral:

- Avaliar as implicações do pneumoperitônio, simulando laparoscopia, com pressão positiva de CO₂ em ratos e seus efeitos nos parâmetros morfológicos e inflamatórios pulmonares.

III.2. Objetivos Específicos:

- Determinar e comparar a morfologia pulmonar observando possíveis alterações teciduais;
- Determinar e comparar os mediadores pró-inflamatórios no tecido pulmonar;
- Determinar e comparar os oxidantes e antioxidantes no tecido pulmonar.

III. 3. Hipótese:

O pneumoperitônio por pressão positiva de CO₂ pode aumentar os níveis de mediadores inflamatórios e estresse oxidativo nos pulmões promovendo a lesão pulmonar, proporcionalmente ao aumento do IAP. Assim, a diminuição da IAP levaria a diminuição das lesões pulmonares.

MATERIAL E MÉTODOS

IV. MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo o projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética para Uso em Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Paulo sob o número 6950190214 aprovado em 17/04/2014 (Anexo 1).

Utilizou-se 48 ratos adultos (*Rattus norvegicus*, com peso aproximado entre 190 a 250 gramas; 4-6 semanas de idade) anestesiados e randomizados utilizando o programa *random* (Random.org). O “Random.org” é um site gerador de números randômicos e gera cerca de 111 milhões de bits randômicos.

Os animais foram divididos em 6 grupos (n=8 por grupo), sendo: Sham: apenas posicionamento do angiocateter intraperitoneal, sem insuflação de PNP; IAP5: uso de pressão intra-abdominal de 5 mmHg de dióxido de carbono (CO₂); IAP8: uso de pressão intra-abdominal de 8 mmHg de CO₂; IAP10: uso de pressão intra-abdominal de 10 mmHg de CO₂; IAP12: pneumoperitônio com 12 mmHg de CO₂; e IAP14: pneumoperitônio com 14 mmHg de CO₂. Todos os animais foram ventilados mecanicamente por 60 minutos após a instalação do PNP, com exceção do grupo Sham, que foi ventilado sem insuflação do PNP, conforme fluxograma abaixo.

Figura 1 - Fluxograma

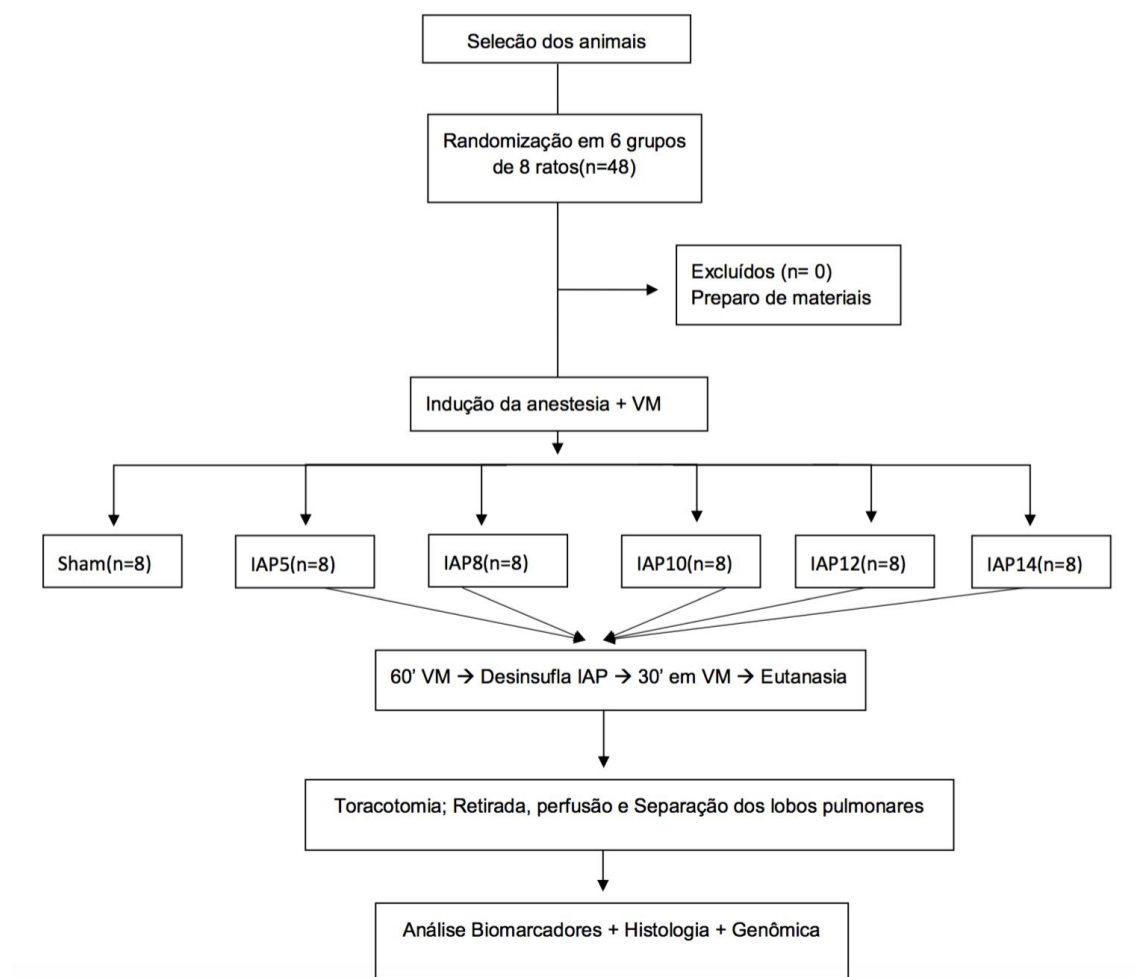


Figura 1. Fluxograma do projeto e seus passos. CEUA: Comissão de Ética no Uso De Animais. IAP: Pressão intra-abdominal do pneumoperitônio, VM: Ventilação mecânica.

Os animais foram mantidos no Biotério da UNIFESP/ EPM Saul Goldenberg (número 24) por um período de 1 semana antes do início do experimento (adaptação e/ou ambientalização) em caixas-padrões com comida e água a vontade (ambas suspensas 2 horas antes do experimento) e em condições ideais de luminosidade (12/12 h ciclo claro/escuro), temperatura

ambiente ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (65%-70%). A anestesia e analgesia foram induzidas com injeção, em bolus, intramuscular (IM) de 50 mg/kg de cloridrato de cetamina (Cetamin®, Syntec, SP, Brasil) e 10 mg/kg de cloridrato de xilazina (Anasedan®, Ceva, SP, Brasil). Quando os animais atingiram o plano anestésico foram posicionados em decúbito dorsal (posição supina) e realizamos a intubação orotraqueal (Figura 2) com cânula intravenosa de 14 Gauges (G), com aproximadamente 3 cm de comprimento para se posicionar um pouco acima da Carina. O relaxamento muscular foi realizado com injeção IM de 2 mg/kg de brometo de pancurônio (Pavulon®, Organon, SP, Brasil) seguido de ventilação mecânica com modo volume-controlado (Ventilator, Harvard Apparatus, MA, EUA) com volume corrente (VT) 5 mL/kg, pressão positiva ao final da expiração (PEEP) de 2 cmH₂O, fração inspirada de oxigênio (FiO₂) de 35%, relação inspiração/expiração de 1:1 e frequência respiratória (Fr) de 60-70 incursões por minuto (ipm). A temperatura corporal foi mantida com cobertor térmico e controlada com termômetro retal ($\sim 37^{\circ}\text{C}$; YSI Inc., OH, EUA).

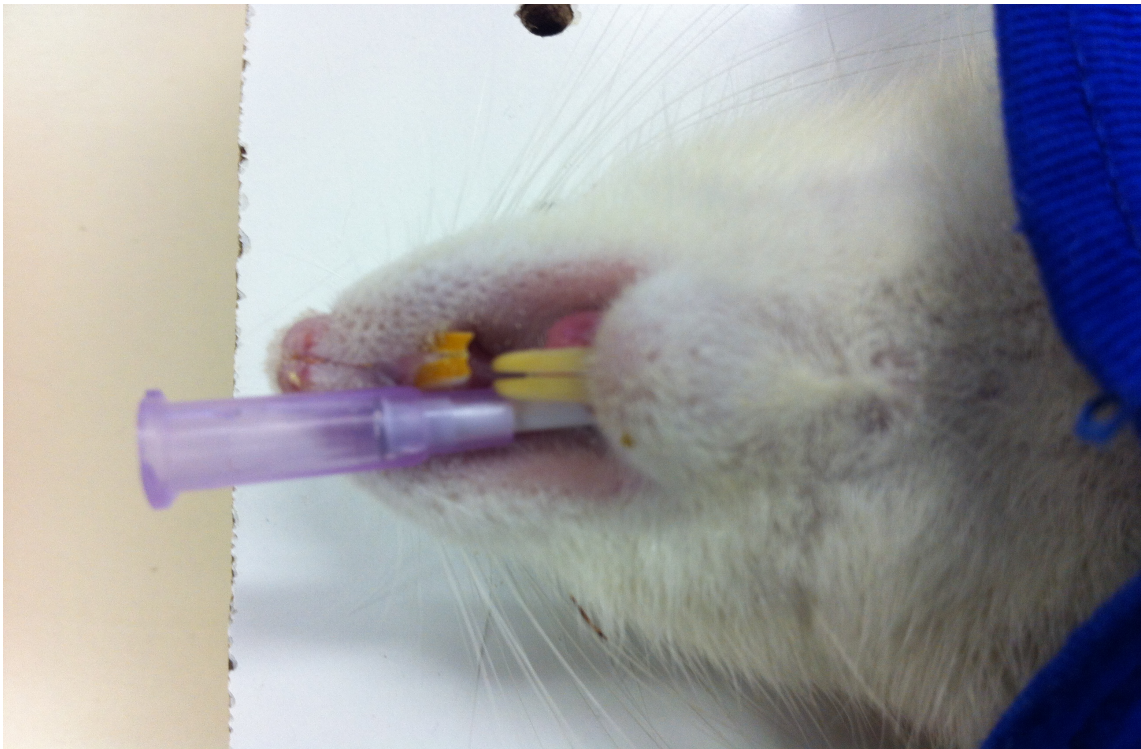


Figura 2. Posicionamento do animal em posição supina e da cânula orotraqueal.

Realizamos a depilação (Figura 3) da região abdominal com creme depilatório (Veet®, Veet, SP, Brasil) e antissepsia da região com álcool iodado 0,1% (Rioquímica, SP, Brasil).

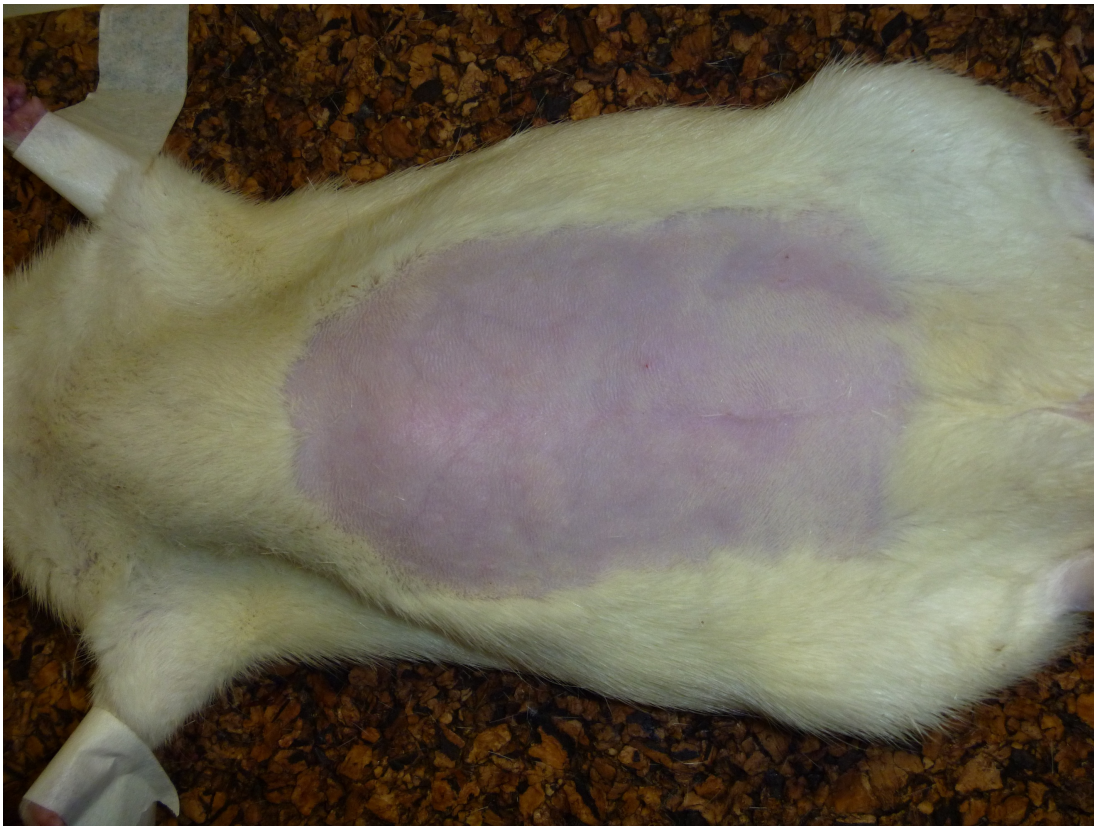


Figura 3. Depilação da região abdominal com utilização de creme depilatório.

O pneumoperitônio foi realizado utilizando uma cânula de 18 G inserida na cavidade peritoneal abaixo do processo xifóide (Figuras 4 e 5) e a insuflação utilizando insuflador automático (Model CO₂ - OP-Pneu Electronic, Wisap, Alemanha) realizada com CO₂ com a IAP mantida constante e controlada por 60 minutos.



Figura 4. Posicionamento e fixação da cânula para insuflação do abdome por dióxido de carbono.

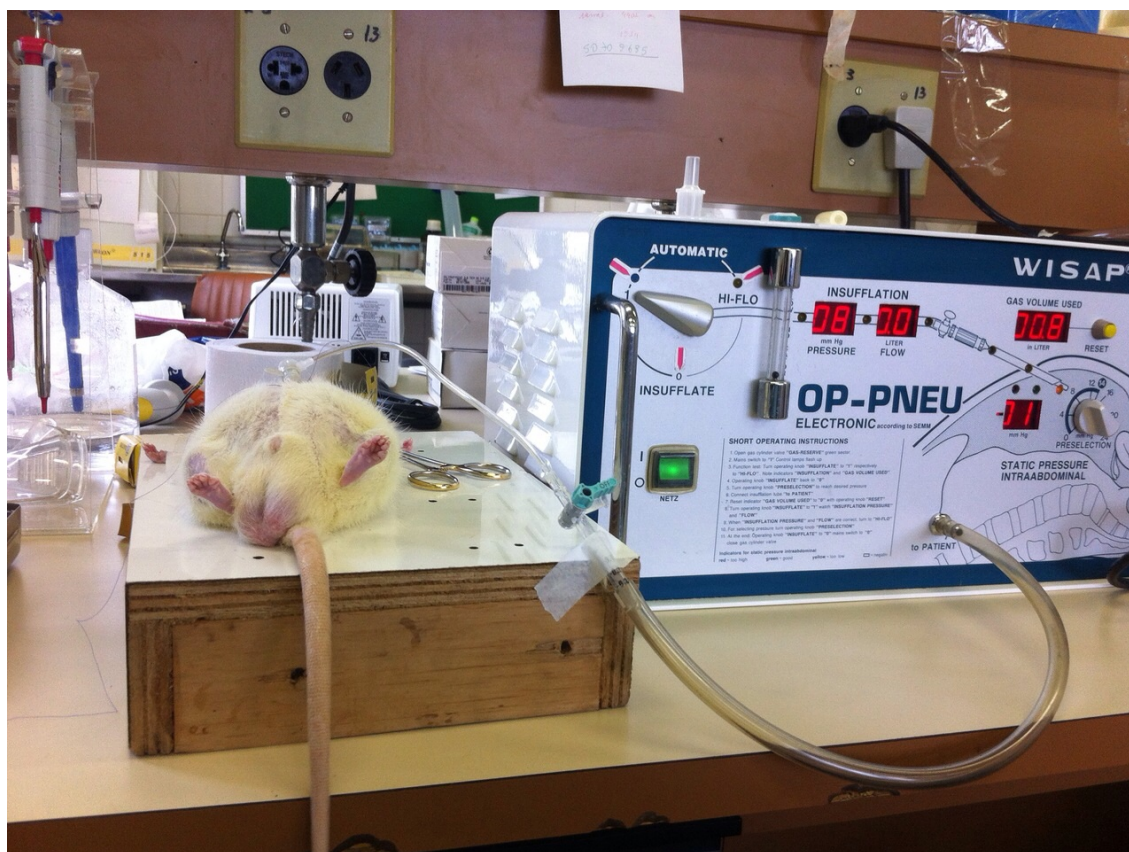


Figura 5. Animal anestesiado com pneumoperitônio insuflado.

Ao final do experimento aguardamos 30 minutos após a desinsuflação do peritônio e em seguida os animais foram eutanasiados com alta dose anestésica (2 mL/kg IV) com T61® (Hoechst-Roussel, Alemanha)^{53,54}. Na sequência, realizamos a toracotomia para a retirada dos pulmões.

Os pulmões foram pesados, perfundidos com solução tampão fosfato (PBS) e o lobo cranial (superior) direito homogeneizado com solução tampão fosfato (Disruptor Ultrassônico, Thornton, SP, Brasil), aliquotado e congelado para a análise de ensaio imunoenzimático (ELISA) com espectrofotômetro (ELX800UV®, BioTek Instruments, VT, EUA) de peroxidação lipídica,

atividade da mieloperoxidase e citocinas. Para os ensaios de reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR), em tempo real, utilizamos os lobos caudais (inferiores) direitos que foram colocados em tubos do tipo Eppendorf com 1,5 mL de solução de TRIzol (Life Technologies, EUA) e congelados em nitrogênio líquido. A porção caudal (inferior) dos pulmões esquerdos foi utilizada para análise histológica.

Avaliação Malondialdeído (MDA)

O grau de lipoperoxidação nos tecidos foi medido através da determinação dos níveis de aldeído malônico ou malondialdeído (MDA). A peroxidação lipídica é uma reação lesiva que se processa durante a reperfusão, na qual o radical hidróxido ($\text{OH}^\cdot$) estimulado pelos radicais livres do oxigênio atinge as membranas celulares e das organelas, atuando sobre os ácidos graxos das cadeias fosfolipídicas presentes nas mesmas, destruindo a função seletiva de barreira que essas membranas realizam e desorganizando a estrutura e a atividade celular. Em condições de normalidade fisiológica os radicais livres formados são neutralizados pela superóxido dismutase (SOD). O MDA é um produto final, gerado pela peroxidação lipídica e desta forma um parâmetro bem estabelecido para determinar o aumento dos radicais livres do oxigênio⁵⁵.

A determinação de malondialdeído foi realizada através da formação de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) utilizando kit específico

(OxiSelect TBARS assay kit, Cell Biolabs, CA, EUA) e seguindo as instruções do fabricante.

Avaliação da Atividade da Mieloperoxidase (MPO)

A atividade da MPO é um indicador de acúmulo de leucócitos polimorfonucleares (PMN) no tecido pulmonar⁵⁶ e sua avaliação foi realizada utilizando ensaio imunoenzimático (MPO Colorimetric Assay, MAK068, Sigma-Aldrich, MO, EUA) seguindo as orientações do fabricante.

Avaliação de Mediadores Pró-Inflamatórios por Ensaio Imunoenzimático (ELISA)

Determinamos as concentrações dos mediadores inflamatórios, TNF-alfa (Rat TNF-alpha Quantikine SixPak [SRTA00]), IL-6 (Rat IL-6 Quantikine SixPak [SR6000B]), IL-1beta (Rat IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine SixPak [SRLB00]), no homogeneizado dos pulmões utilizando a técnica de ELISA, seguindo as orientações do fabricante (R&D System, MN, EUA).

Avaliação dos Antioxidantes por Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

Preparação do RNA e quantificação por RT-PCR em tempo-real

Para a realização deste ensaio utilizamos pool de pulmões de cada animal alocado em seu respectivo grupo, ou seja, um pool por grupo.

Primeiramente o RNA total foi extraído do tecido pulmonar usando reagente TRIzolTM (Life Technologies, CA, EUA) e purificado utilizando Minikit RNeasyTM (Quiagen, CA, EUA). A concentração do RNA total foi avaliada por espectrofotometria e a quantidade acessada por eletroforese em gel de agarose a 2%. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado utilizando 1µg do RNA total e RT² First Strand kit (SABiosciences Qiagen, EUA), quantidades iguais de cDNA e de Master Mix SYBRTM Green qPCR Mastermix (SABiosciences Qiagen, CA, EUA) foram distribuídos na placa de arranjos contendo sequências específicas. A reação foi realizada em placa com 96 poços (arrays) da SABiosciences (Rat Endothelial Cell Biology RT² ProfilerTM, Catálogo PAMM-065; Qiagen, CA, EUA), seguindo o protocolo do fabricante, para detecção de genes relacionados com o estresse oxidativo acompanhada de 5 genes controles (ACTB, GAPDH, Hsp90ab1, Hprt1, Gusb) utilizados para a normalização de dados do arranjo de PCR, e um controle negativo para controle de contaminação do DNA genômico. A sequência do controle negativo detecta transcrições não específicas. Três poços para controles de transcrição reversa (RTCs) foram utilizados para verificar a eficiência da reação de RT com ensaio de qPCR. Os controles de PCR positivos replicados (PPCs) foram utilizados para determinar a eficiência da reação em cadeia da polimerase por si mesma. Os dois sets de poços para a replicação do controle (RTCs e PPCs) foram utilizados para comprovar a consistência inter-poços e intra-placas. A avaliação

dos dados foi realizada com programa (MxPro Equipment Real Time Systems, GE, EUA) que calcula os valores do limiar do ciclo (threshold cycle; Ct) para todos os genes do arranjo, sendo realizada uma comparação por pares e calculando as alterações de dobra (*fold changes*) na expressão gênica dos dados brutos do ciclo utilizando o método delta-delta Ct ($\Delta\Delta Ct$)⁵⁷⁻⁵⁹. O método foi utilizado para determinar os níveis de expressão relativa dos genes de interesse (SOD1, SOD2 e SOD3) contidos nas amostras e avaliados pelo programa PCR Array Data Analysis v3.3 (SABiosciences, Qiagen, CA, EUA).

Avaliação Histológica

Para esta avaliação fragmentos de pulmão de cada animal foram convenientemente embebidos em formaldeído a 10% tamponado (tampão fosfato) por 8 horas e depois desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanizados pelo xilol e impregnados pela parafina líquida em estufa, regulada à temperatura de 59°C, segundo a metodologia estabelecida em nosso Laboratório para inclusão em parafina⁶⁰. O material foi incluído em parafina e os blocos cortados em micrótomo do tipo Minot (Accu-Cut®, SaKura Finetek, CA, EUA), ajustado para 4 µm. Alguns cortes assim obtidos foram colocados em lâminas previamente untadas com albumina de Mayer e mantidos em estufa regulada à temperatura de 37°C, durante 24 horas, para secagem e colagem. Uma lâmina de cada animal foi então submetida ao método

de coloração pela hematoxilina e eosina (HE) para posterior análise morfológica. Na análise morfológica foi utilizado microscópio de luz (Axiolab™ Standart 2.0, Carl Zeiss, Alemanha) com objetivas variando de 4 a 400 X para caracterização e descrição de cada corte histológico levando em conta: ruptura de septo alveolar (grau de edema tecidual) e presença de infiltrado leucocitário (resposta inflamatória). A coleta de imagens foi realizada por câmara acoplada ao microscópio (AxionCam™ Carl Zeiss, Alemanha). O índice de escore foi realizado com base na avaliação das lâminas de histologia por um patologista que não conhecia a que grupo cada animal pertencia, sendo: 0= sem lesão; 1= lesão mínima (pouco edema); 2= lesão moderada (edema e presença de hemácias); 3= lesão grave (edema, presença de hemácias e PMN); 4= lesão severa (edema, presença de hemácias, PMN e ruptura de septo alveolar).

V. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as variáveis foram testadas em relação a sua distribuição de normalidade. Foram apresentadas por média, desvio padrão ($M \pm DP$) e erro padrão e graficamente por média e intervalo de confiança (IC) de 95% para média. Para as comparações intergrupos utilizou-se o teste ANOVA, e análise de variância grupo a grupo pelo teste de Turkey. As comparações estatísticas entre o grupo controle e os demais grupos experimentais foram feitas por meio do ajuste do teste *t*Dunnett. Para todas as comparações foram considerados significativos os resultados para um valor de $p < 0,05$. Os resultados da histologia foram demonstrados de maneira descritiva e comparativa. O software utilizado para a análise estatística dos resultados foi o Stata[®] na versão 13.0. As análises estatísticas das amostras de expressão gênica foram realizadas dentro do programa PCR Array Data Analysis (v3.3) da empresa que confeccionou a placa com os genes (Thermo Fisher Scientific, MA, EUA).

RESULTADOS

VI. RESULTADOS

Durante os experimentos não perdemos nenhum dos animais na vigência dos procedimentos. Abaixo, encontram-se descritos os resultados para os parâmetros analisados de MDA, MPO, TNF-alfa, IL-1beta, IL-6 e expressão gênica de SOD, respectivamente, além das descrições dos resultados das análises histológicas com figuras ilustrativas das alterações.

Houve diferença significativa nos níveis de MDA (Tabela: 1; Figura 6) para todas as comparações entre o grupo Sham e dos demais grupos experimentais, exceto quando comparado o grupo experimental (IAP5) com o grupo Sham ($p=0,75$).

Tabela 1 - Descrição das médias e dos parâmetros para a média em amostras para o experimento MDA (nmol/g proteína)

	N	Média	Erro padrão da média
Sham	8	21,50	1,01
IAP5	8	21,12	1,10
IAP8	8	31,00	1,16
IAP10	8	44,25	2,47
IAP12	8	51,37	1,25
IAP14	8	61,37	1,23
Total	48	38,43	2,27

*teste ANOVA. Teste Turkey para análise da variância entre grupos: IAP5/IAP8: $p=0,001$; IAP5/IAP10: $p=0,001$; IAP5/IAP12: $p=0,001$; IAP5/IAP14: $p=0,001$; IAP8/IAP10: $p=0,001$; IAP8/IAP12: $p=0,001$; IAP8/IAP14: $p=0,001$; IAP10/IAP12: $p=0,02$ e IAP10/IAP14: $p=0,001$; IAP12/IAP14: $p=0,001$. Teste de *t*Dunnett para análise da variância entre o

grupo controle Sham com experimentos: IAP5: $p=0,99$; IAP8: $p=0,01$; IAP10: $p=0,00$; IAP12: $p=0,00$ e IAP14: $p=0,00$.

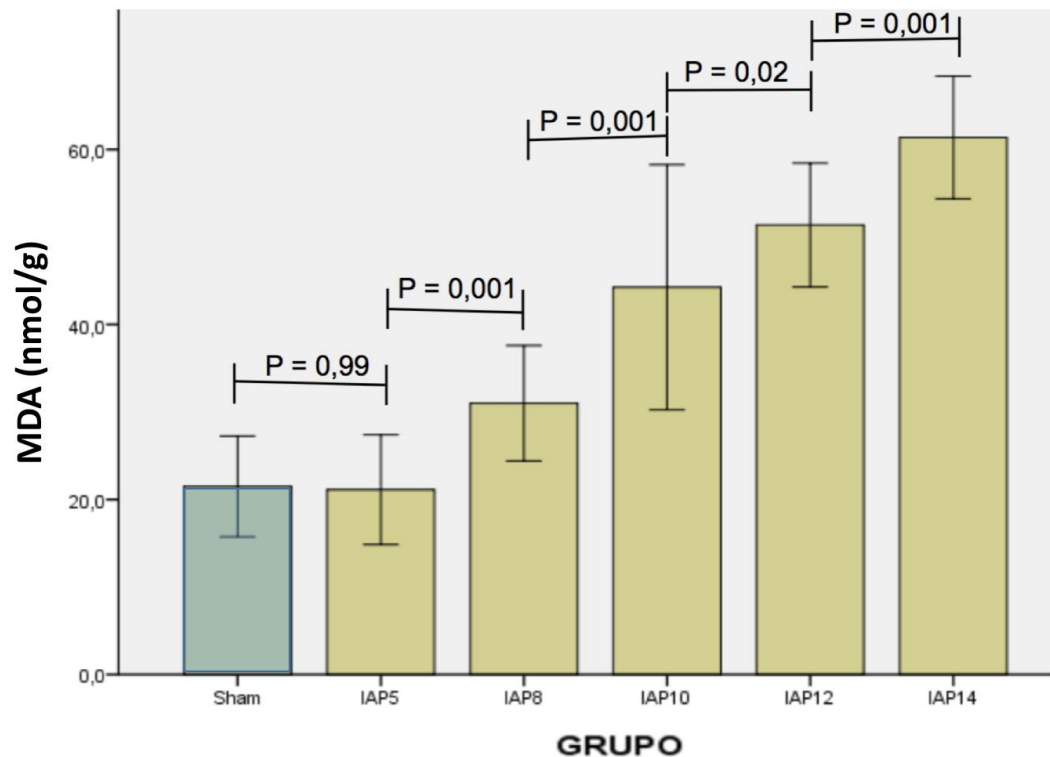


Figura 6. Histograma mostrando a distribuição da produção de MDA e, indiretamente, a produção de ERO nos diferentes grupos, evidenciando o aumento diretamente proporcional ao aumento da IAP.

Houve diferença significativa para a análise de MPO (Tabela: 02; Figura 7) todas as comparações entre o grupo Sham e os demais grupos experimentais, exceto quando comparado o grupo IAP5 e com o grupo Sham ($p=0,99$). As comparações entre os grupos experimentais foram significativas entre si para todos os grupos ($p<0,001$).

Tabela 2 - Descrição das médias e dos parâmetros para a média em amostras para o experimento MPO (mU/mL).

		N	Média	Erro padrão da média
MPO	Sham	8	3,15	0,20
	IAP5	8	3,81	0,16
	IAP8	8	5,41	0,21
	IAP10	8	6,45	0,21
	IAP12	8	7,92	0,24
	IAP14	8	12,90	1,00
	Total	48	6,60	0,50

*teste ANOVA. Teste Turkey para análise da variância entre grupos: IAP5/IAP8: $p=0,15$; IAP5/IAP10: $p=0,001$; IAP5/IAP12: $p=0,001$; IAP5/IAP14: $p=0,001$; IAP8/IAP10: $p=0,59$; IAP8/IAP12: $p=0,001$; IAP8/IAP14: $p=0,001$; IAP10/IAP12: $p=0,22$ e IAP10/IAP14: $p=0,001$; IAP12/IAP14: $0,001$. Teste de *t*Dunnett para análise da variância entre o grupo controle Sham com experimentos: IAP5: $p=0,75$; IAP8: $p=0,001$; IAP10: $p=0,001$; IAP12: $p=0,001$ e IAP14: $p=0,001$.

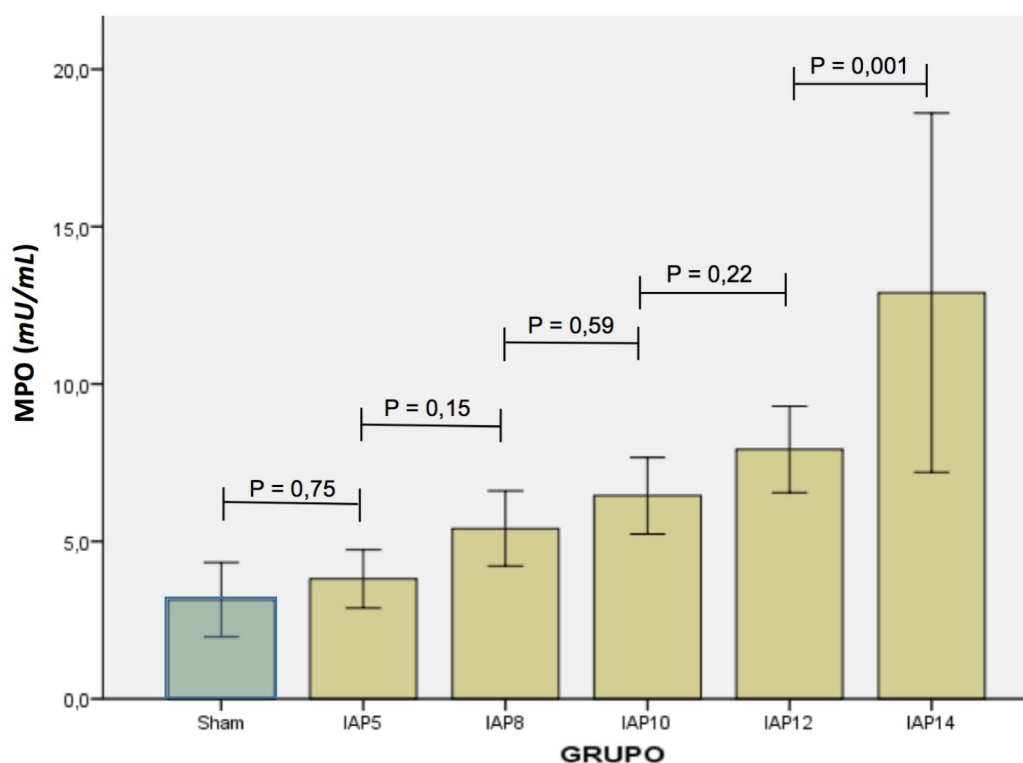


Figura 7. Histograma mostrando a distribuição da produção de MPO e, indiretamente, o recrutamento neutrifílico nas amostras selecionadas dos diferentes grupos, evidenciando o aumento diretamente proporcional ao aumento da IAP.

Observa-se que os valores de TNF-alfa (Tabela 3; Figura 8) foram significativamente maiores para todos os experimentos, quando comparados como grupo Sham ($p < 0,001$), exceto quando comparado o grupo IAP5 com o grupo Sham ($p = 0,23$).

Tabela 3 – Descrição das médias e dos parâmetros para a média em amostras para o experimento TNF-alfa (pg/mL).

		N	Média	Erro padrão da média
TNF- alfa	Sham	8	5,39	0,09
	IAP5	8	5,61	0,06
	IAP8	8	5,77	0,05
	IAP10	8	5,87	0,03
	IAP12	8	6,33	0,06
	IAP14	8	7,60	0,04
	Total	48	6,09	0,10

*teste ANOVA. Teste Turkey para análise da variância entre grupos: IAP5/IAP8: $p=0,45$; IAP5/IAP10: $p=0,06$; IAP5/IAP12: $p=0,001$; IAP5/IAP14: $p=0,001$; IAP8/IAP10: $p=0,88$; IAP8/IAP12: $p=0,001$; IAP8/IAP14: $p=0,001$; IAP10/IAP12: $p=0,001$ e IAP10/IAP14: $p=0,001$; IAP12/IAP14: $p=0,001$. Teste de *t*Dunnett para análise da variância entre o grupo controle Sham com experimentos: IAP5: $p=0,11$; IAP8: $p=0,01$; IAP10: $p=0,001$; IAP12: $p=0,001$ e IAP14: $p=0,001$.

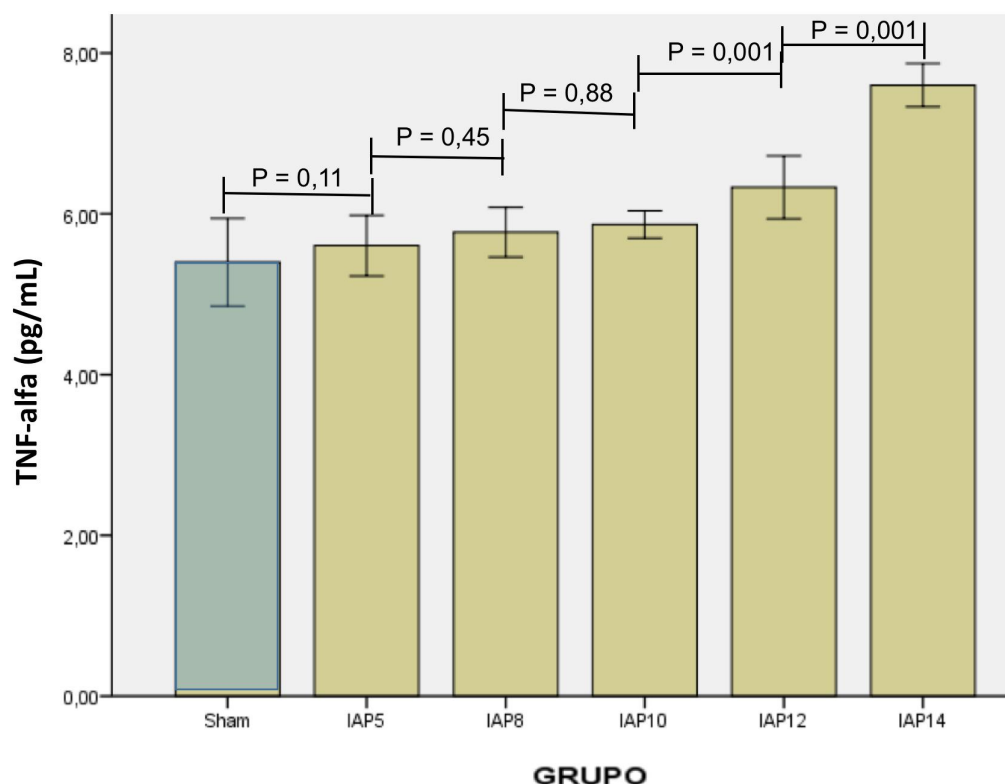


Figura 8. Histograma mostrando a distribuição da produção de TNF-alfa nos diferentes grupos, evidenciando o aumento diretamente proporcional ao aumento da IAP.

Houve diferença significativa nos níveis de IL-1beta para todas as comparações entre o grupo Sham e dos demais grupos experimentais, exceto quando comparado o grupo IAP5 com o grupo Sham ($p=0,98$) (Tabela 4 e Figura 9).

Tabela 4 - Descrição das médias e dos parâmetros para a média em amostras para o experimento IL-1beta (pg/mL).

	N	Média	Erro padrão da média
Sham	8	5,92	0,24
IAP5	8	6,03	0,18
IAP8	8	7,05	0,12
IL- IAP10	8	9,72	0,34
1b IAP12	8	10,88	0,15
IAP14	8	13,85	0,35
Total	48	8,91	0,43

*teste ANOVA. Teste Turkey para análise da variância entre grupos: IAP5/IAP8: $p=0,07$; IAP5/IAP10: $p=0,001$; IAP5/IAP12: $p=0,001$; IAP5/IAP14: $p=0,001$; IAP8/IAP10: $p=0,001$; IAP8/IAP12: $p=0,001$; IAP8/IAP14: $p=0,001$; IAP10/IAP12: $p=0,03$ e IAP10/IAP14: $p=0,001$; IAP12/IAP14: $p=0,001$. Teste de *t*Dunnett para análise da variância entre o grupo controle Sham com experimentos: IAP5: $p=0,98$; IAP8: $p=0,01$; IAP10: $p=0,001$; IAP12: $p=0,001$ e IAP14: $p=0,001$.

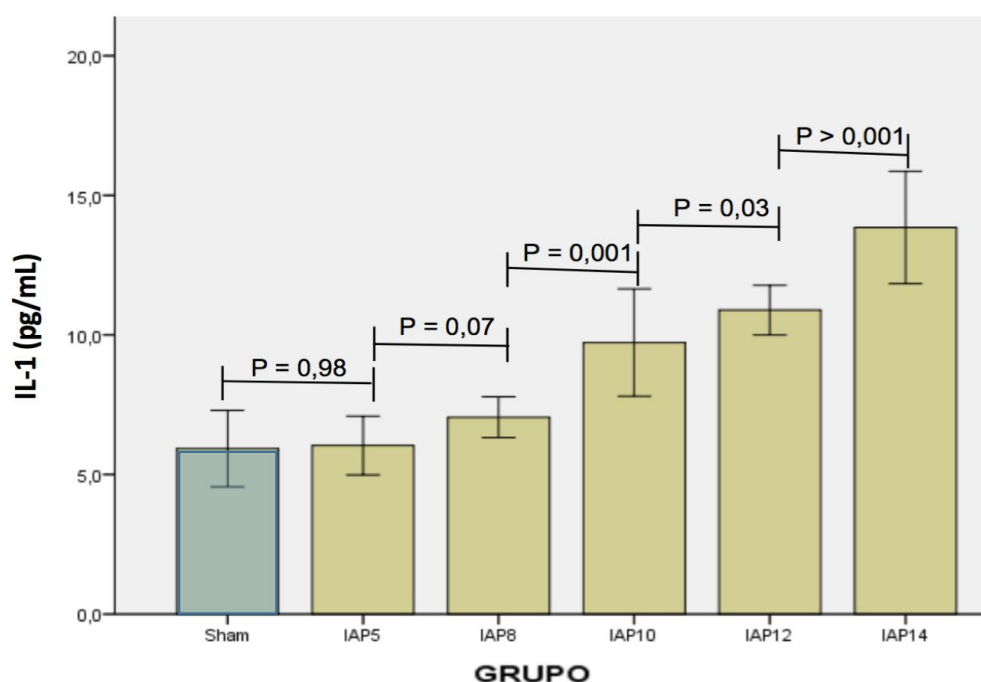


Figura 9. Histograma mostrando a distribuição da produção de Il-1b e, indiretamente, a resposta inflamatória nas amostras selecionadas dos diferentes grupos, evidenciando o aumento diretamente proporcional ao aumento da IAP.

Os valores de IL-6 (Tabela: 5; Figura 10) foram significativamente maiores para todas as comparações entre o grupo Sham e os demais grupos experimentais ($p=0,001$).

Tabela 5 - Descrição das médias e dos parâmetros para a média em amostras para o experimento IL-6 (pg/mL).

	N	Média	Erro padrão da média
Sham	8	7,24	0,28
IAP5	8	7,76	0,14
IAP8	8	8,26	0,03
IAP10	8	8,92	0,02
IAP12	8	9,75	0,02
IAP14	8	14,61	0,08
Total	48	9,42	0,36

*teste ANOVA. Teste Turkey para análise da variância entre grupos: IAP5/IAP8: $p=0,12$; IAP5/IAP10: $p=0,001$; IAP5/IAP12: $p=0,001$; IAP5/IAP14: $p=0,001$; IAP8/IAP10: $p=0,02$; IAP8/IAP12: $p=0,001$; IAP8/IAP14: $p=0,001$; IAP10/IAP12: $p=0,01$ e IAP10/IAP14: $p=0,001$; IAP12/IAP14: $p=0,001$. Teste de *t*Dunnett para análise da variância entre o

grupo controle Sham com experimentos: IAP5: $p=0,04$; IAP8: $p=0,001$; IAP10: $p=0,001$; IAP12: $p=0,001$ e IAP14: $p=0,001$.

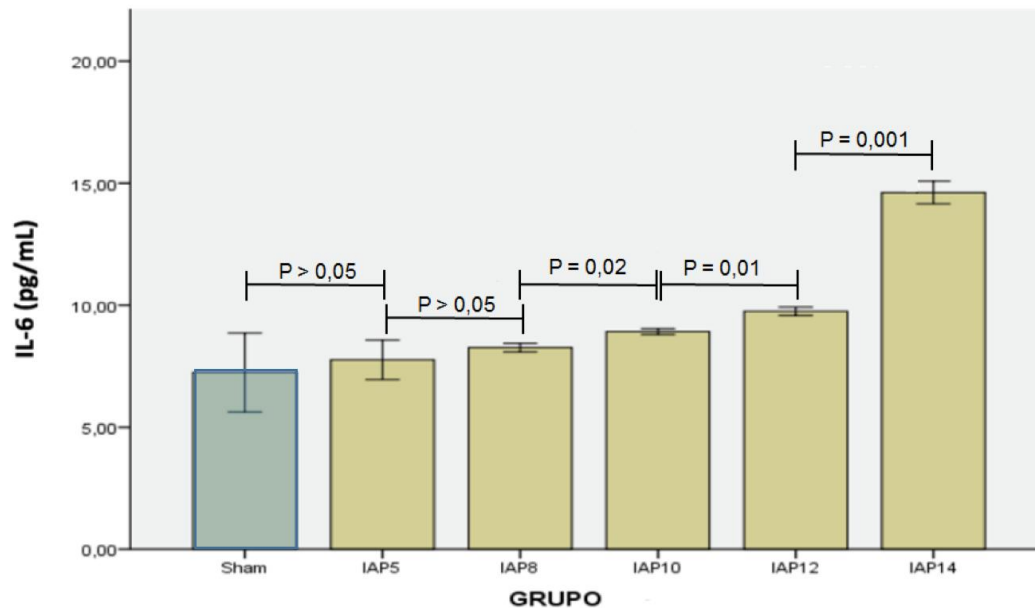


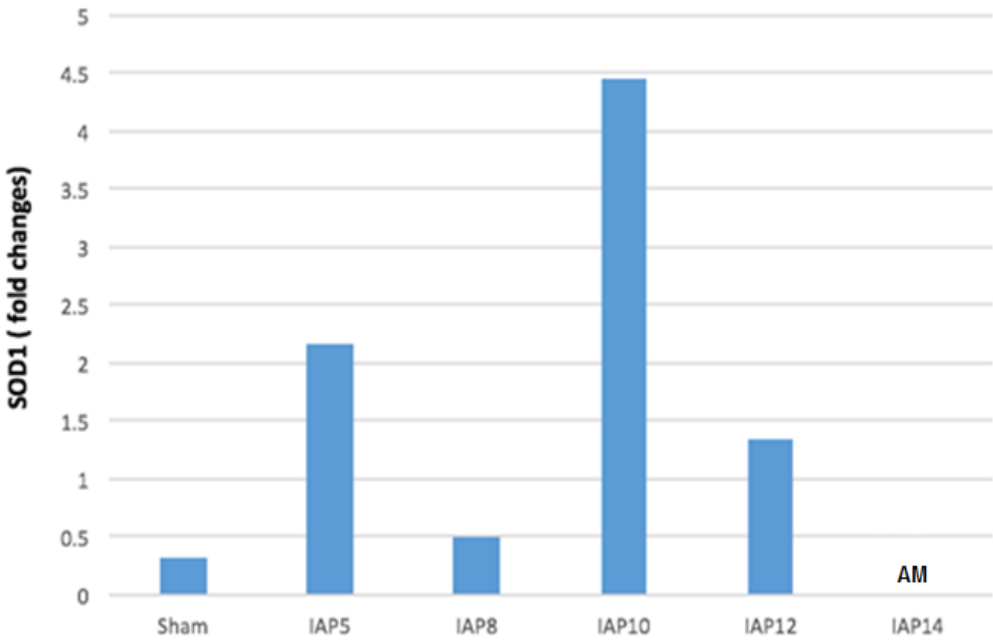
Figura 10. Histograma mostrando a distribuição da produção de Il-6 e, indiretamente, a resposta inflamatória nas amostras selecionadas dos diferentes grupos, evidenciando o aumento diretamente proporcional ao aumento da IAP.

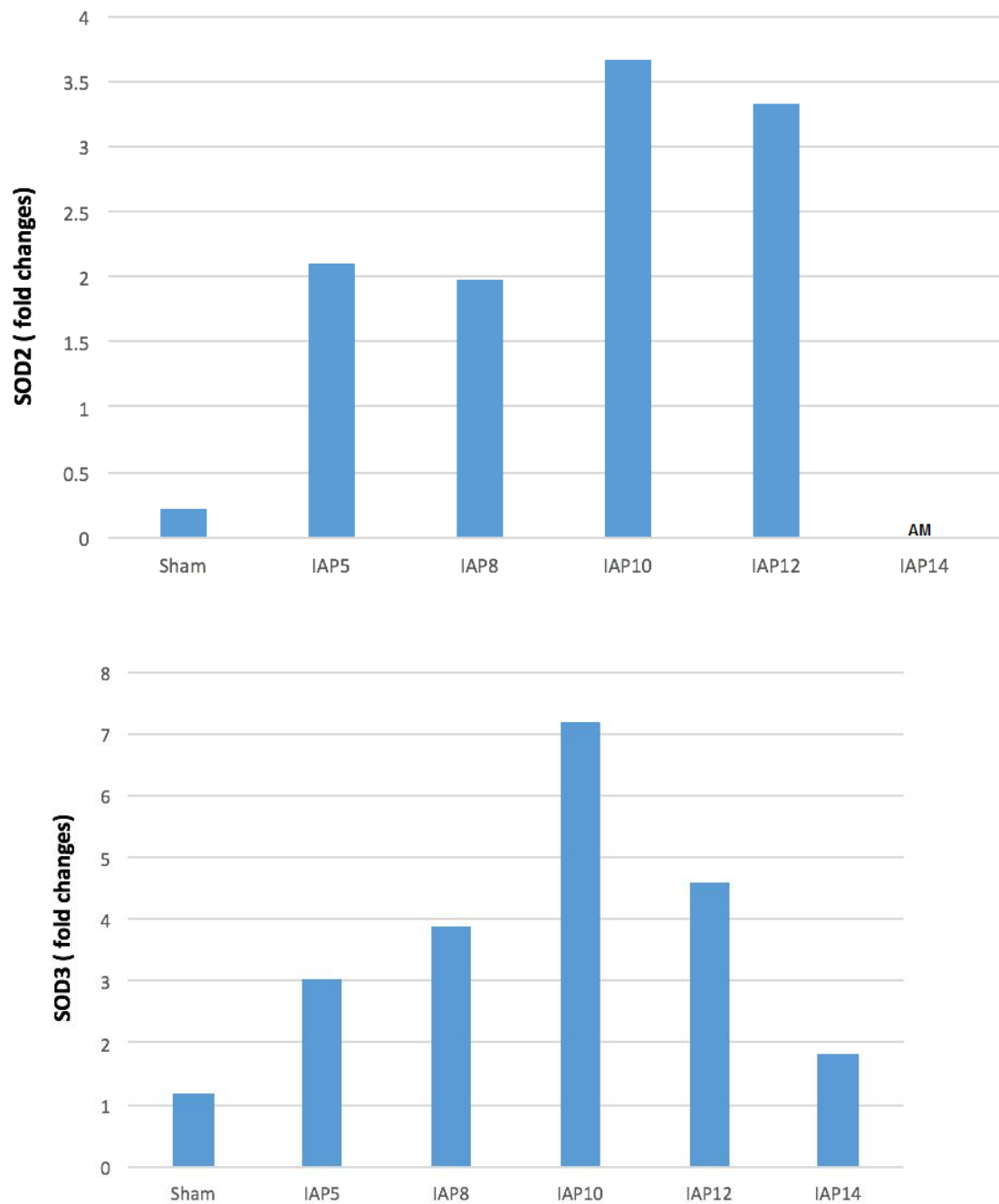
Os dados referentes a expressão gênica foram significativos e corroboram com nossos outros achados (Tabela 6; Figuras 11, 12 e 13). As superóxidos dismutases (SOD1, SOD2 e SOD3) são enzimas antioxidantes e apresentaram diferenças significativas conforme a pressão utilizada.

Tabela 6: Descrição dos genes estudados e o valor da expressão gênica encontrado no pool de amostras de cada grupo.

Gene	Sham	IAP5	IAP8	IAP10	IAP12	IAP14
SOD1	0,325	2,165	0,499	4,449	1,329	AM
SOD2	0,216	2,096	1,972	3,667	3,331	AM
SOD3	1,193	3,029	3,880	7,192	4,609	1,813

Expressão de SOD1: Sham vs IAP5, IAP10, IAP12 e IAP14 (p < 0,05); IAP5 vs IAP8, IAP10, IAP12 e IAP14 (p < 0,05); IAP8 vs IAP10, IAP12 e IAP14 (p < 0,05); IAP10 vs, IAP12 (p > 0,05) e IAP14 (p < 0,05); e IAP12 vs IAP14 (p < 0,05). Expressão de SOD2: Sham vs IAP5, IAP10, IAP12 e IAP14 (p < 0,05); IAP5 vs IAP8, IAP10, IAP12 e IAP14 (p < 0,05); IAP8 vs IAP10, IAP12 e IAP14 (p < 0,05); IAP10 vs, IAP12 e IAP14 (p < 0,05); e IAP12 vs IAP14 (p < 0,05). Expressão de SOD3: Sham vs IAP5, IAP10, IAP12 e IAP14 (p < 0,05); IAP5 vs IAP8 (p < 0,05), IAP10, IAP12 e IAP14 (p < 0,05); IAP8 vs IAP10, IAP12 e IAP14 (p < 0,05); IAP10 vs, IAP12 e IAP14 (p < 0,05); e IAP12 vs IAP14 (p < 0,05). AM: abaixo do mínimo detectável.





Figuras 11, 12 e 13. Valores e distribuições da expressão gênica encontradas nas amostras de cada grupo (média). Abreviaturas: AM= abaixo do mínimo detectável.

Nas análises histológicas observamos que nas amostras de tecidos pulmonares de ratos dos grupos IAP5 e IAP8 apresentaram danos leves,

enquanto que nos grupos IAP10 e IAP12 exibiram danos moderados e o grupo IAP14 exibiu danos mais graves.

Na avaliação histológica (Figura 14 e 15), a análise dos diferentes grupos demonstrou alterações histológicas mais perceptíveis e caracterizáveis nos grupos submetidos a regimes de maiores pressões intra-abdominais. As diferenças foram mais claras quando se comparou os grupos extremos (Sham e menores pressões *vs.* maiores pressões). No grupo submetido a regime de maiores pressões (IAP14) havia marcadamente grave ruptura dos septos alveolares, edema, hemorragia e presença de maior infiltrado leucocitário. Os grupos IAP10 e IAP12 apresentaram alteração na arquitetura alveolar com edema e dilatação dos septos alveolares, além de infiltração de neutrófilos, porém, em graus menores do que o grupo IAP14 e claramente maiores do que os grupos submetidos a pressões menores (IAP8 [que também apresenta um pouco de edema], IAP5 e Sham). As amostras de tecidos pulmonares do grupo IAP8 exibiram algumas alterações da arquitetura, aumento dos septos alveolares e pequena infiltração de neutrófilos, embora em grau menor do que os grupos submetidos a regimes de pressões maiores.

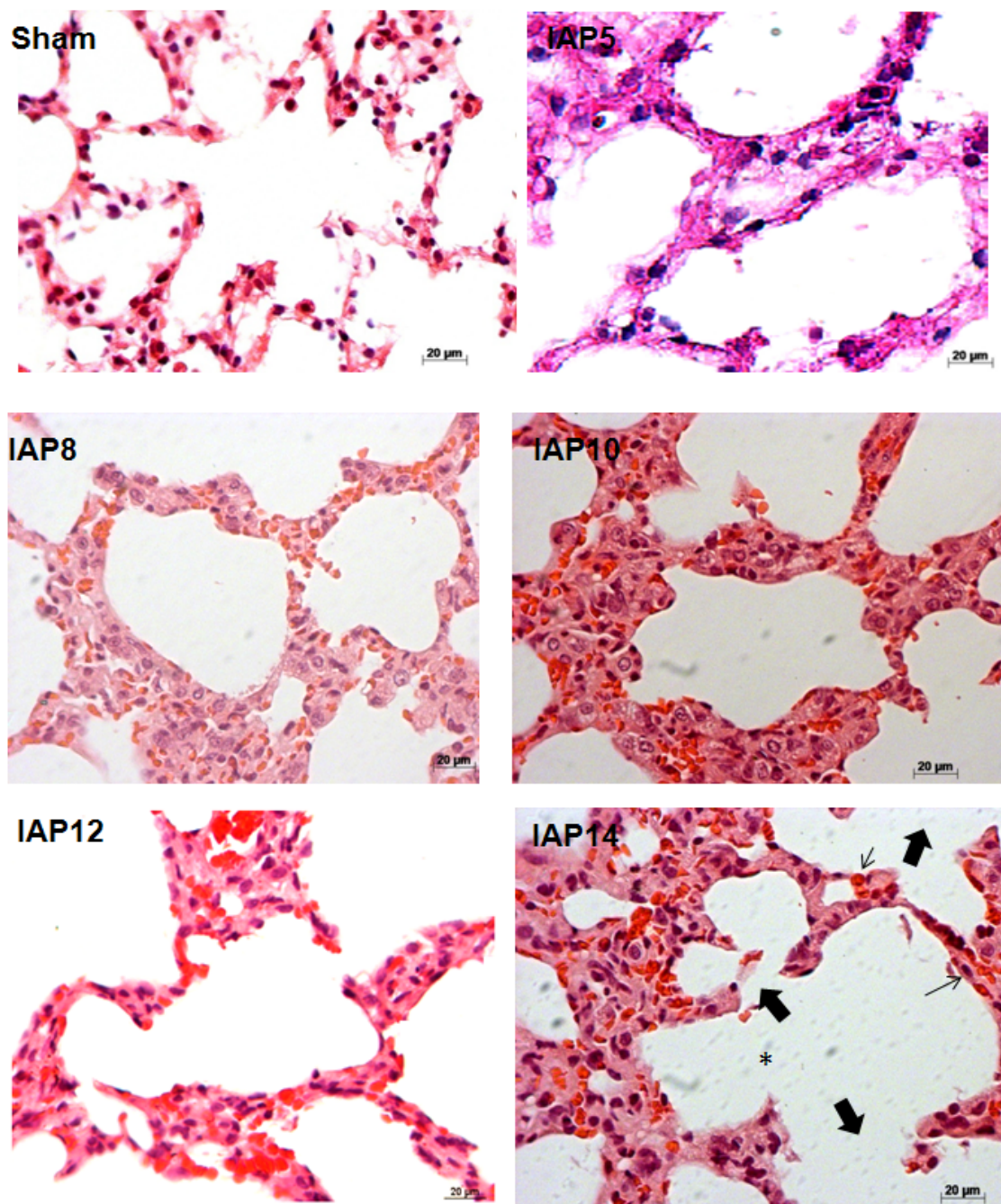


Figura 14: Avaliação histológica das amostras de tecido pulmonar mostrando as diferenças entre os grupos estudados. Podem-se observar no grupo IAP14 rupturas do septo alveolar (setas cheias), edema (asterisco), hemácias (seta

curta) e influxo de PMN (seta longa), sendo lesões mais severas quando comparadas com os grupos com menores pressões.

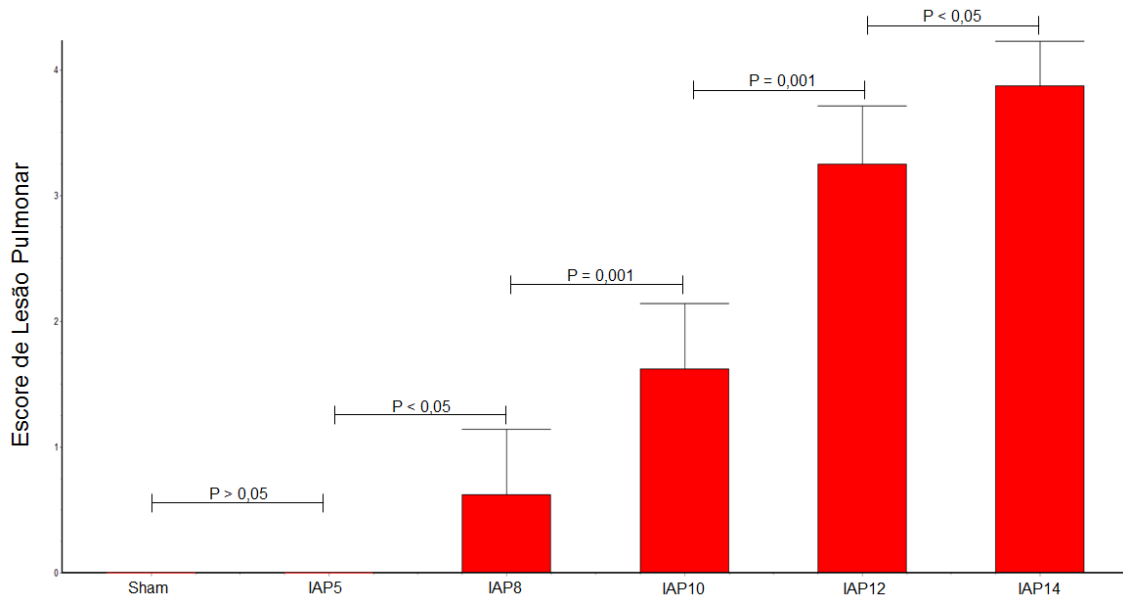


Figura 15: Histograma mostrando a distribuição do escore de lesão pulmonar nas amostras selecionadas dos diferentes grupos, evidenciando o aumento de maior escore diretamente proporcional ao aumento da IAP. *teste ANOVA. Teste Turkey para análise da variância entre grupos: IAP5/IAP8: $p < 0,05$; IAP8/IAP10: $p = 0,001$; IAP10/IAP12: $p = 0,001$; IAP12/IAP14: $p < 0,05$. Teste de *t*Dunnett para análise da variância entre o grupo Sham e o grupo IAP5 demonstrou significância estatística quando comparado com os grupos: IAP8, IAP10, IAP12 e IAP14; $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

VII. DISCUSSÃO

Os radicais livres de oxigênio são responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular, peroxidação lipídica da membrana celular e início do processo inflamatório local e sistêmico. Os resultados encontrados neste trabalho foram bastante consistentes e mantiveram um padrão de constante também nos diferentes grupos estudados, mostrando a relação direta entre a pressão de insuflação do PNP e as alterações pulmonares de acordo com as análises realizadas (peroxidação lipídica, atividade da mieloperoxidase, mediadores pró-inflamatórios, histologia e expressão gênica de antioxidante).

Parece existir uma alta correlação entre o aparecimento destas lesões descritas e o aumento da produção de ERO e demais marcadores inflamatórios, diretamente proporcionais. Todavia, esta correlação positiva especificamente entre alterações de MDA versus acúmulo de polimorfonucleares (MPO) parece ser mais clara quando se comparam os grupos controle e de baixa pressões com o grupo IAP14 ($p=0,001$).

Para todos os parâmetros utilizados, as diferenças foram significativas comparando os grupos, com exceção de alguns dos parâmetros avaliados quando se comparou o grupo Sham e o grupo de menor pressão, IAP5. Ao se comparar grupos de maiores (IAP10, IAP12 e IAP14) e menores pressões (Sham, IAP5 e

IAP8) entre si, as diferenças foram mais expressivas, evidenciando o efeito do PNP sobre as alterações pulmonares agudas.

Rubbini et al.⁶¹, em 2012, mostraram o efeito do PNP sobre as propriedades mecânicas do pulmão. Associaram ainda as modificações destas propriedades com os diversos posicionamentos dos pacientes na mesa operatória (proclive e trendeleburg), mostrando o perfil de alteração da elastância e resistência pulmonares com e sem a insuflação do PNP durante ventilação mecânica volume-controlada em indivíduos sedados adequadamente e com bloqueio neuromuscular. As regiões basais (mais próximas do diafragma relaxado e “empurrado” cranialmente pela força exercida pelo PNP) e dependentes foram as mais afetadas, sendo as regiões onde há maior formação de atelectasias e onde ocorrem suas maiores consequências para o sistema respiratório⁶¹.

Em outro trabalho, Runck et al.⁶², em 2012, demonstraram a diminuição da complacência no sistema respiratório após a insuflação do IAP em ratos ventilados mecanicamente. O aumento progressivo da IAP promove redução inversamente proporcional da complacência respiratória.

A diminuição da complacência no sistema respiratório implica em aumento médio das pressões inspiratórias para compensação, levando ao aumento da *driving pressure*, à exposição do sistema respiratório a regimes menos fisiológicos de maiores pressões e, conseqüentemente, mais

inflamação e produção de ERO⁶¹⁻⁶⁴. Para evitar atelectasia, hipoxemia e lesões pulmonares, a PEEP não deve ser negligenciada para contrabalancear o aumento da IAP. Assim, quanto maior for a IAP, maior será resistência no sistema respiratório, o que tem relação direta com o aumento dos marcadores inflamatórios e de produção de ERO⁶¹, em conformidade com os nossos resultados.

Strang et al., em modelo porcino, em diversos estudos evidenciou a correlação direta entre o aumento da IAP e a taxa média de atelectasias. Desta forma, em porcos ventilados mecanicamente e em posição supina, foram aplicadas diferentes IAP com CO₂ e avaliado o percentual de atelectasia presentes nestes animais após a aplicação do PNP, onde verificou-se que nos controles (sem insuflação) havia em média 4% de atelectasias, nos animais submetidos a IAP de 8 mmHg, 9%, no grupo com IAP de 12 mmHg, 12% e no último grupo, com 16 mmHg, 16% de atelectasias, mostrando a relação direta entre o aumento da pressão de insuflação do PNP e a presença de atelectasias⁶⁵⁻⁶⁸.

Para alcançar o uso de pressões mais baixas de insuflação do pneumoperitônio, sem diminuir significativamente o campo cirúrgico ou atrapalhar a técnica operatória, uma das estratégias é a implementação do uso de doses adequadas dos bloqueadores neuromusculares

adespolarizantes⁶⁹⁻⁷⁰, associada a monitorização constante para manutenção das doses nos momentos apropriados, de acordo com a avaliação do monitor da junção neuromuscular, desde que este seja devidamente calibrado de acordo com o paciente. A manutenção do bloqueio neuromuscular profundo está associada a maior complacência da parede abdominal, resultando na necessidade de menores pressões para insuflação, minimizando as alterações no sistema respiratório⁶⁹⁻⁷¹.

O bloqueio neuromuscular profundo associa-se a melhores escores de qualidade de campo cirúrgico quando indagado ao cirurgião em campo, sem comprometer o pós-operatório e sem curarização residual, quando feito adequadamente^{69, 72-74}.

Do ponto de vista clínico, há diversos trabalhos demonstrando que com o uso de menores pressões de insuflação do PNP há menor incidência de dor pós-operatória, incluindo avaliações sobre o menor uso de analgésicos no pós-operatório imediato, além de menores escores de dor baseados na escala internacional de dor, alta mais precoce, com tempo cirúrgico similar às cirurgias nas quais se usam pressões maiores^{69-72,75,78}.

Este estudo mostra a tendência de demonstração encontrada em outros trabalhos com ratos nos quais associa menores IAP a menor produção de ERO⁷⁶, com níveis menores de MDA quantificados e associados a baixas

pressões de insuflação. Percebeu-se ainda em outros estudos que os valores de MDA se elevam diretamente proporcional ao tempo de exposição ao PNP⁷⁹, item não avaliado por nós, especificamente, uma vez que todos os nossos grupos tiveram o mesmo tempo de ventilação mecânica durante a exposição ao PNP, 60 minutos. Níveis de IAP acima de 12 mmHg são marcadamente associados a valores mais altos dos marcadores de produção de ERO. Para o MPO não foi diferente, estando ainda associado também ao tempo de exposição ao IAP^{76,79, 80}.

O PNP induz o estresse oxidativo sistemicamente. No pulmão não é diferente, ainda mais submetido a um regime de pressões não fisiológicas, o que acentua ainda mais a alteração da homeostase. Os fatores inflamatórios promovidos pela cirurgia em si, pela pressão que o PNP implica, e pela VM em si promovem a formação destas ERO e são tempo-dependente da exposição⁷⁹⁻⁸¹.

Dentre os diferentes animais usados em atividades de pesquisa experimental e os humanos há diversas diferenças anatômicas, fisiológicas, incluindo a mecânica pulmonar, como exemplo da elastância e resistência, que determinam diferentes resultados. O que se estuda e se deve levar em consideração como ponto de referência são as tendências nos resultados comparativos entre regiões pulmonares e respostas fisiológicas. Há modelos de estudos que tentaram calcular as IAPs em animais equivalentes às

respectivas no humano, demonstrando que as pressões não são exatamente equivalentes, mas a demonstração da progressão e da comparação entre os grupos com diferentes IAP, para diferentes animais, mostram consistências em relação ao padrão de lesão promovido pelo aumento gradativo da IAP^{82,83}. Assim, valores absolutos não parecem possuir significância quando se comparam as IAP em diferentes animais, mesmo quando expostos às mesmas condições.

Apesar dos pulmões serem órgãos bastante afetados por oxidantes exógenos e espécies reativas de oxigênio endógenas, nosso organismo possui sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos que buscam neutralizar os efeitos lesivos dos produtos de espécies reativas endógenas, desta forma nas afecções pulmonares o equilíbrio tende para o lado do oxidante⁷⁹⁻⁸¹.

As alterações pulmonares causadas pelo pneumoperitônio levam a um desequilíbrio dos sistemas antioxidantes, uma vez que foram detectados em nosso estudo a expressão gênica de antioxidantes como o SOD1 e SOD2 que foram significativamente menores no grupo IAP14 comparado com os outros grupos e o SOD3 que apesar de ser expresso em todos os grupos estava menor no grupo IAP14 comparado com os outros grupos submetidos à pressões menores.

Não podemos esquecer que o mecanismo pelo qual a manipulação cirúrgica provoca alterações inflamatórias podem estar ligadas ao trauma local, na serosa, que conduz a uma resposta inflamatória no trato gastrointestinal, pela indução da lesão por isquemia-reperfusão em decorrência de uma interrupção ou redução temporária do fluxo da microcirculação que em nosso caso ocorreu por uma compressão das estruturas peritoneais. Desta forma vários modelos experimentais de laparoscopia demonstraram alterações imunológicas no peritônio após laparotomia, sendo estas alterações mais pronunciadas com a exposição dos órgãos abdominais ao ar ambiente do que ao CO₂^{84,85}.

Em nosso estudo as expressões de SOD1 se mostraram maiores no grupo IAP10 e não houve expressão significativa no grupo IAP14, o mesmo ocorrendo na expressão do SOD2. Tal situação pode ser resultado de uma maior necessidade de determinados grupos em produzirem antioxidantes e a não expressão no grupo de maior pressão pode significar uma sobrecarga do sistema. Vários estudos demonstraram o caráter protetor contra as ERO e nossos achados corroboram com tais estudos⁸⁶⁻⁸⁹.

Por outro lado, o SOD3, que está bem documentado sua existência na matriz extracelular de células pulmonares do tipo II e macrófagos alveolares^{90,91}, também esteve expresso em todos os grupos sendo menor no grupo IAP14. Tal condição ocorre porque sua atividade é 1,8 vezes superior à

SOD1 e SOD2 ⁹², o que poderia justificar a sua expressão no grupo IAP14 em relação a não expressão de SOD1 e SOD2 no referido grupo. A Literatura não é clara quanto a esta expressão diferenciada na SOD1 e 2 para os grupos de maior pressão (IAP 14). Uma possibilidade seria para o seu perfil de expressão ser diferente e não suportado para tais níveis de lesão celular. A resposta para esta pergunta talvez possa ser dada com estudos mais aprofundados sobre este grupo especificamente.

Em nosso estudo, os exames histopatológicos dos tecidos pulmonares tiveram consistência com diversos dados bioquímicos avaliados, dependendo da faixa de IAP analisada. Os indicadores histológicos demonstram significativa lesão tecidual nos grupos IAP12 e IAP14, uma vez que existe um maior confronto de pressões por conta da ventilação mecânica associada a insuflação intra-abdominal, levando provavelmente a uma hipoperfusão pulmonar. Por outro lado, baixas pressões intra-abdominais reduzem o dano pulmonar confirmando os efeitos benéficos do uso de menores pressões intra-abdominais.

O uso de métodos que possibilitem a utilização de pressões de insuflação do pneumoperitônio em valores menores podem trazer benefícios para os pulmões, levando a menores níveis de atelectasias, menores agressões ao tecido pulmonar e menor inflamação.

Desta forma os nossos resultados podem embasar e estimular estudos que avaliem a necessidade da utilização de intervenções que reduzam os riscos de complicações respiratórias no pós-operatório de cirurgias por laparoscopia. Com base nestes resultados deste estudo experimental percebe-se a necessidade de estudos clínicos para avaliar os reais efeitos do pneumoperitônio nos pulmões de pacientes submetidos a laparoscopia.

Limitações do estudo:

Uma limitação consistiu na manutenção do padrão uniforme dos parâmetros ventilatórios, uma vez que os animais dos diferentes grupos foram expostos a IAPs diferentes e isto certamente afetou a ventilação pulmonar. A mecânica respiratória altera-se com a insuflação do pneumoperitônio e isto cria a necessidade do uso do conceito de pressão transpulmonar, que é a diferença entre a pressão alveolar e a pressão intrapleural ($\text{Pressão transpulmonar} = \text{Pressão alveolar} - \text{Pressão pleural}$)^{63,93}. Assim, quanto maior a pressão ao redor do pulmão (vindas da parede torácica e do diafragma, totalmente influenciáveis pela insuflação do pneumoperitônio), maior terá que ser a pressão ofertada pelo ventilador para manter um mesmo padrão de ventilação. Caso não exista uma compensação adequada, com os diferentes valores de IAP submetidos, haverá diferentes insuflações pulmonares. Dados da literatura sugerem que o “desmembramento” das pressões que chegam ao sistema respiratório, utilizando as medidas obtidas dos ventiladores mecânicos mais o uso de uma sonda esofágica que mede indiretamente a pressão pleural pode medir mais precisamente os gradientes de pressões que efetivamente são utilizados para a insuflação pulmonar⁹³⁻⁹⁶. Assim, talvez, possam descrever e servir como definidor de condutas nas estratégias para ventilação em diferentes níveis de

pneumoperitônio e para procedimentos que exijam inclinações significativas das mesas cirúrgicas (procline ou trendeleburg).

CONCLUSÃO

VIII. CONCLUSÃO

Este estudo experimental evidencia que o aumento da IAP durante o pneumoperitônio associado à ventilação mecânica causa efeitos adversos potenciais no pulmão, nem sempre percebidos clinicamente, favorecendo áreas de colapso que causam inflamação e estresse oxidativo evidenciado pela histopatologia e bioquímica, dependendo da magnitude do aumento da IAP, com elevação diretamente proporcional ao aumento da IAP.

IX. ANEXOS:

Anexo 1: Comprovante de aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa da UNIFESP em 17/04/2014.

Comitê de Ética em Pesquisa

4/17/14, 15:56

Principal | Formulários ▾ | Resoluções | Orientações | Atribuições | CEUA: Experimentação Animal | Contato | CEUA/CEP |

CEUA Nº 6950190214 Registrado em: 24/02/2014
Título: "EFEITO DO PNEUMOPERITÔNIO: ESTUDO PROSPECTIVO EXPERIMENTAL COM ANÁLISE COMPARATIVA DE VARIAÇÕES MORFOLÓGICAS E INFLAMATÓRIAS PULMONARES."
Documentos anexados: 1.) 0. Projeto de pesquisa 2.) 1. Termo de compromisso 3.) Termo de Compromisso Datado.

Data	Documento	Comentário da CEUA	Status
24/02/2014	Projeto de Pesquisa	Após esclarecidas as dúvidas, o projeto foi aprovado. (17/04/2014).	APROVADO

[Recabida](#) [Visualizar](#) [Incluir doc](#) [Sair](#)

Desenvolvido por: SRD - Scientific Research Data

Rua Botucatu, 572, 1º andar conjunto 14 CEP 04023-061 São Paulo - tel: 55 (11) 5571-1062 / fax: 55 (11) 5539-7162
Horário de atendimento: das 9:00 as 13:00hs - e-mail: cepunifesp@unifesp.br

REFERÊNCIAS

IX. REFERÊNCIAS

1. Shabanzadeh DM, Sorensen LT. Laparoscopic surgery compared with open surgery decreases surgical site infection in obese patients: a systematic review and meta-analysis. *Ann Surg.* 2012; 256: 934-45.
2. Nguyen KT, Marsh JW, Tsung A, Steel JJ, Gamblin TC, Geller DA. Comparative benefits of laparoscopic vs open hepatic resection: a critical appraisal. *Arch Surg.* 2011; 146: 348-56.
3. Gurusamy KS, Samraj K, Fusai G, Davidson BR. Early versus delayed laparoscopic cholecystectomy for biliary colic. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008: CD007196.
4. Takata MC, Kebebew E, Clark OH, Duh QY. Laparoscopic bilateral adrenalectomy: results for 30 consecutive cases. *Surg Endosc.* 2008; 22: 202-7.
5. Grace PA, Quereshi A, Coleman J, Keane R, McEntee G, Broe P, Osborne H, Bouchier-Hayes D. Reduced postoperative hospitalization after laparoscopic cholecystectomy. *Br J Surg.* 1991; 78: 160-2.
6. Joris J, Cigarini I, Legrand M, Jacquet N, De Groote D, Franchimont P, Lamy M. Metabolic and respiratory changes after cholecystectomy performed via laparotomy or laparoscopy. *Br J Anaesth.* 1992; 69: 341-5.

7. Schafer M, Sagesser H, Reichen J, Krahenbuhl L. Alterations in hemodynamics and hepatic and splanchnic circulation during laparoscopy in rats. *Surg Endosc.* 2001; 15: 1197–1201.
8. Melo MAC, Albuquerque OF, Gondim V. Colecistectomia Laparoscópica Em Pacientes De Alto Risco. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2003; 30(1): 11-15.
9. Curet, MJ - Special problems in laparoscopic surgery. Previous abdominal surgery, obesity, and pregnancy. *Surg Clin North Am*, 2000, 80:1093-1110.
10. Campos FG. Treinamento em vídeo-cirurgia. *Rev Bras Videocir.* 2006;4(1):1-2
11. Unsal MA, Imamoglu M, Cay A, Kadioglu M, Aydin S, Ulku C, Kesim M, Alver A, Bozkaya H. The acute alterations in biochemistry, morphology and contractility of the rat isolated urinary bladder induced by increased intra-abdominal pressure. *Gynecol Obstet Invest.* 2006; 61: 179-87.
12. Gutt CN, Oniu T, Mehrabi A. Circulatory and respiratory complications of carbon dioxide insuflation. *Dig Surg.* 2004; 21: 95-105
13. Ivankovich AD, Miletich DJ, Albrecht RF, Heyman HJ, Bonnet RF. Cardiovascular effects of intraperitoneal insufflation with carbon dioxide and nitrous oxide in the dog. *Anesthesiology.* 1975; 42: 281-7.
14. Gannedahl P, Odeberg S, Brodin LA, Sollevi A. Effects of posture and pneumoperitoneum during anaesthesia on the indices of left ventricular filling. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1996; 40: 160-6.

15. Lentschener C, Axler O, Fernandez H, Megarbane B, Billard V, Fouqueray B, Landault C, Benhamou D. Haemodynamic changes and vasopressin release are not consistently associated with carbon dioxide pneumoperitoneum in humans. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2001; 45: 527-35.
16. Dexter SP, Vucevic M, Gibson J, McMahon MJ. Hemodynamic consequences of high- and low-pressure capnoperitoneum during laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc*. 1999; 13: 376-81.
17. Unsal MA, Imamoğlu M, Kadioğlu M, Aydın S, Ulku C, Kesim M, Alver A, Bozkaya H. The acute alterations in biochemistry, morphology, and contractility of rat-isolated terminal ileum via increased intra-abdominal pressure. *Pharmacol Res*. 2006; 53: 135-41.
18. Schilling MK, Redaelli C, Krahenbühl, Signer C, Büchler MW. Splanchnic microcirculatory changes during CO₂ laparoscopy. *J Am Coll Surg*. 1997; 184: 378-82.
19. Torrielli R, Cesarini M, Winnock S, Cabiro C, Mene JM. Hemodynamic changes during celioscopy: a study carried out using thoracic electric bioimpedance. *Can J Anaesth*. 1990; 37: 46-51.
20. Hirvonen EA, Nuutinen LS, Kauko M. Hemodynamic changes and pneumoperitoneum during laparoscopic hysterectomy. *Acta Anaesthesiol Scand*. 1995; 39: 949-55.
21. Walder AD, Aitkenhead AR. Role of vasopressin in the haemodynamic response to laparoscopic cholecystectomy. *Br J Anaesth*. 1997; 78: 264-6.

22. Joris JL, Chiche JD, Canivet JL, Jaquet NJ, Legros JJ, Lamy ML. Hemodynamic changes induced by laparoscopy and their endocrine correlates: effects of clonidine. *J Am Coll Cardiol.* 1998; 32: 1389-96.
23. McBeth PB, Zygun DA, Widder S, Cheatham M, Zengerink I, Glowa J, Kirkpatrick AW. Effect of patient positioning on intra-abdominal pressure monitoring. *Am J Surg.* 2007; 193: 644-7; discussion 647.
24. Russo A, Marana E, Viviani D, Polidori L, Colicci S, Mettimano M, Proietti R, Di Stasio E. Diastolic function: the influence of pneumoperitoneum and Trendelenburg positioning during laparoscopic hysterectomy. *Eur J Anaesthesiol.* 2006; 26: 923-7.
25. Laurito CE, Baughman VL, Becker GL, Cunningham F, Pygon BH, Citron GM. Oral clonidine blunts the hemodynamic responses to brief but not prolonged laryngoscopy. *J Clin Anesth.* 1993; 5: 54-7.
26. Doray DA, Greene FL, Baysinger CL. Hemodynamic changes during laparoscopic cholecystectomy monitored with transeophageal echocardiography. *Surg Endosc.* 1995; 9: 128-33; discussion 33-4.
27. Papparella A, Nino F, Coppola S. Peritoneal Morphological Changes due to Pneumoperitoneum: The Effect of Intra-abdominal Pressure. *Eur J Pediatr Surg.* 2014; 24: 322–7.
28. Fahy BG, Barnas GM, Flowers JL. The Effects of Increased Abdominal Pressure on Lung and Chest Wall Mechanics During Laparoscopic Surgery. *Anesth Analg* 1995;81:744-50.

29. Nguyen NT, Anderson JT, Budd M. Effects of pneumoperitoneum on intraoperative pulmonary mechanics and gas exchange during laparoscopic gastric bypass. *Surg Endosc* (2004) 18: 64–71.
30. Nguyen NT, Wolfe BM. The Physiologic Effects of Pneumoperitoneum in the Morbidly Obese – Review. *Ann Surg* 2005;241: 219 -26 .
31. Chiu AW, Chang LS, Birkett DH, Babayan RK. The impact of pneumoperitoneum, pneumoretroperitoneum, and gasless laparoscopy on the systemic and renal hemodynamics. *J Am Coll Surg*. 1995;181:397–406.
32. Hirvonen EA, Poikolainen EO, Paakkonen ME, Nuutinen LS. The adverse hemodynamic effects of anesthesia, head-up tilt, and carbon dioxide pneumoperitoneum during laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc*. 2000;14:272–7.
33. Szold A, Weinbroum AA. Carbon dioxide pneumoperitoneum related liver injury is pressure dependent: A study in an isolated perfused organ model. *Surg Endosc*. 2008; 22: 365-71.
34. Unsal MA, Guven S, Imamoglu M, Aydin S, Alver A. The effect of CO₂ insufflation-desufflation attacks on tissue oxidative stress markers during laparoscopy: a rat model. *Fertil Steril*. 2009; 92: 363-8.
35. Cay A, Imamoglu M, Unsal MA, Aydin S, Alver A, Akyol A, Sarihan H. Does anti-oxidant prophylaxis with melatonin prevent adverse outcomes related to increased oxidative stress caused by laparoscopy in experimental rat model? *J Surg Research*. 2006; 135: 2-8.

36. Cevrioglu AS, Yilmaz S, Koken T, Tokyol C, Yilmazer M, Fenkci IV. Comparison of the effects of low intra-abdominal pressure and ischaemic preconditioning on the generation of oxidative stress markers and inflammatory cytokines during laparoscopy in rats. *Hum Reprod.* 2004; 19: 2144-51.
37. Branche PE, Duperret SL, Sagnard PE, Boulez JL, Petit PL, Viale JP. Left ventricular loading modifications induced by pneumoperitoneum: a time course echocardiographic study. *Anesth Analg.* 1998; 86: 482-7.
38. Mutoh T, Lamm WJ, Embree LJ, Hildebrandt J, Albert RK. Volume infusion produces abdominal distension, lung compression, and chest wall stiffening in pigs. *J Appl Physiol.* 1992; 72: 575-82.
39. Duggan M, Kavanagh BP. Pulmonary atelectasis: a pathogenic perioperative entity. *Anesthesiology.* 2005; 102: 838-54.
40. Magnusson L, Spahn DR. New concepts of atelectasis during general anaesthesia. *Br J Anaesth.* 2003; 91: 61-72.
41. Grasso S, Terragni P, Mascia L, Fanelli V, Quintel M, Herrmann P, Hedenstierna G, Slutsky AS, Ranieri VM. Airway pressure-time curve profile (stress index) detects tidal recruitment/hyperinflation in experimental acute lung injury. *Critical Care Med.* 2004; 32: 1018-27.
42. Polat C, Yilmaz S, Serteser M, Koken T, Kahraman A, Dilek ON. The effects of different intraabdominal pressures on lipid peroxidation and

protein oxidation status during laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endosc.* 2003; 17: 1719-22.

43. Eleftheriadis E, Kotzampassi K, Botsios D, Tzartinoglou E, Farmakis H, Dadoukis J. Splanchnic ischemia during laparoscopic cholecystectomy. *Surg Endos.* 1996; 10: 324-6.

44. Richards WO, Scovill W, Shin B, Reed W. Acute renal failure associated with increased intra-abdominal pressure. *Ann Surg.* 1983; 197: 183-7.

45. Glantzounis GK, Tselepis AD, Tambaki AP, Manataki AD, Galaris DA, Tsimoyiannis EC, Kappas AM. Laparoscopic surgery-induced changes in oxidative stress markers in human plasma. *Surg Endosc.* 2001; 15: 1315-9.

46. Wu MH, Wang MY, Yang CY, Lee PH, Lin MT. Inflammatory response attenuation in patients undergoing gasless laparoscopic gastrectomy. *Hepatogastroenterology.* 2013; 60: 439-42.

47. Rush JW, Turk JR, Laughlin MH. Exercise training regulates SOD-1 and oxidative stress in porcine aortic endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 284: H1378-87.

48. Corona R, Binda MM, Mailova K, Verguts J, Koninckx PR. Addition of nitrous oxide to the carbon dioxide pneumoperitoneum strongly decreases adhesion formation and the dose-dependent adhesiogenic effect of blood in a laparoscopic mouse model. *Fertil Steril.* 2013. [Epub ahead of print].

49. Bessler M, Whelan RL, Halverson A, Treat MR, Nowygrod R. Is immune function better preserved after laparoscopic versus open colon resection? *Surg Endosc.* 1994; 8: 881-3.
50. Barbaros U, Ozarmagan S, Erbil Y, Bozbora A, Cakar N, Eraksoy H, Kapran Y, Kiran B. Effects of pneumoperitoneum created through CO₂ insufflation and parameters of mechanical ventilation (PEEP application) on systemic dissemination of intraabdominal infections. *Surg Endosc.* 2004; 18: 501-7.
51. Dreyfuss D, Saumon G. Ventilator-induced lung injury: lessons from experimental studies. *Am J Respir Crit Care Med.* 1998; 157: 294-323.
52. Andrade PV, Dos Santos JM, Silva HC, Wilbert DD, Cavassani SS, Oliveira-Júnior IS. Influence of hyperoxia and mechanical ventilation in lung inflammation and diaphragm function in aged versus adult rats. *Inflammation.* 2014;37(2):486-94.
53. Webb, A.I. Euthanizing agents. In: *Veterinary pharmacology and Therapeutics.* Riviere, J.E; Papich, M.G (Eds). Ames: Wiley – Blackwell, 2009. p. 401 – 407.
54. Artwohl J, et al. 2006. Report of the ACLAM task force on rodent euthanasia. *JAALAS*, v. 45, p. 98-105.
55. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1990; 186: 421-31.

56. Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: Friend and Foe. *J Leukoc Biol.* 2005; 77(5): 598-625.
57. Schreck, R, K. Albermann, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells (a review). *Free Radic Res Commun.* 1992; 17(4): 221-37.
58. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-Delta Delta C (T) method. *Methods.* 2001; 25: 402-8.
59. Taha MO, Ferreira RM, Taha NS, Monteiro HP, Caricati-Neto A, Oliveira-Junior IS, Fagundes DJ. Ischemic preconditioning and the gene expression of enteric endothelial cell biology of rats submitted to intestinal ischemia and reperfusion. *Acta Cir Bras.* 2013; 28: 167-73.
60. Ramallo BT, Lourenço E, Cruz RH, Almeida JC, Taha MO, Silva PY, Oliveira-Junior IS. A comparative study of pentoxifylline effects in adult and aged rats submitted to lung dysfunction by thermal injury. *Acta Cir Bras.* 2013; 28: 154-9.
61. Rubini A, Monte DD, Catena V. Effects of the pneumoperitoneum and Trendelenburg position on respiratory mechanics in the rats by the end-inflation occlusion method. *Ann Thorac Med.* 2012;7(4):205-9.
62. Runck H, Schumann S, Tacke S, Haberstroh J, Guttman J. Effects of intra-abdominal pressure on respiratory system mechanics in mechanically ventilated rats. *Respir Physiol Neurobiol.* 2012; 180 (2-3): 204–10.

63. Amato MB, Meade MO, Slutsky AS, Brochard L, Costa EL, Schoenfeld DA, Stewart TE, Briel M, Talmor D, Mercat A, Richard JC, Carvalho CR, Brower RG. Driving pressure and survival in the acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2015; 372(8): 747-55.
64. Ozmen MM, Zulfikaroglu B, Col C, Cinel I, Isman FK, Cinal L, Besler TH. Effect of increased abdominal pressure on cytokines (IL1b, IL6, TNFa), C-reactive Protein (CRP), Free Radicals (NO, MDA), and Histology. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*. 2009;19 (2):142-7.
65. Strang CM, Hachenberg T, Fredén F, Hedenstierna G. Development of atelectasis and arterial to end-tidal PCO₂-difference in a porcine model of pneumoperitoneum. *Br J Anaesth*. 2009; 103(2):298-303.
66. Strang CM, Fredén F, Maripuu E, Hachenberg T, Hedenstierna G. Ventilation-perfusion distributions and gas exchange during CO₂-pneumoperitoneum in a porcine model. *Br J Anaesth*. 2010; 105(5):691-7.
67. Strang C. The effect of the CO₂ – Pneumoperitoneum on perfusion distribution of the lung. Digital Comprehensive summaries of Uppsala dissertations from the Faculty of medicine, 2011. 1651-6206; 662.
68. Strang CM, Ebmeyer U, Maripuu E, Hachenberg T, Hedenstierna G. Improved ventilation-perfusion matching by abdominal insufflation (pneumoperitoneum) with CO₂ but not with air. *Minerva Anesthesiol*. 2013 Jun;79(6):617-25.
69. Staehr-Rye AK, Rasmussen LS, Rosenberg J, Juul P, Lindekaer AL, Riber C, Gatke MR. Surgical space conditions during low-pressure laparoscopic cholecystectomy with deep versus moderate neuromuscular

blockade: a randomized clinical study. *Anesth Analg* 2014; 119: 1084–92.

70. Kopman AF, Naguib M. Laparoscopic Surgery and Muscle Relaxants: Is Deep Block Helpful? *Anesth Analg* 2015; 120: 51–8.

71. Lindekaer AL, Springborg HH, Istre O. Deep Neuromuscular Blockade Leads to a Larger Intraabdominal Volume During Laparoscopy. *J Vis Exp.* 2013 Jun 25; (76): 50045.

72. Dubois PE, Putz L, Jamart J, Marotta ML, Gourdin M, Donnez O. Deep neuromuscular block improves surgical conditions during laparoscopic hysterectomy. A randomised controlled trial. *Eur J Anaesthesiol* 2014; 31:430–6.

73. Boon M, Martini CH, Aarts LP, Bevers RF, Dahan A. Effect of variations in depth of neuromuscular blockade on rating of surgical conditions by surgeon and anesthesiologist in patients undergoing laparoscopic renal or prostatic surgery (BLISS trial): study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* 2013 Mar 1;14:63.

74. Martini CH, Boon M, Bevers RF, Aarts LP, Dahan A. Evaluation of surgical conditions during laparoscopic surgery in patients with moderate vs deep neuromuscular block. *Br J Anaesth.* 2014; 112 (3): 498–505.

75. Vijayaraghavan N, Sistla SC, Kundra P. Comparison of standard-pressure and low-pressure pneumoperitoneum in laparoscopic cholecystectomy: a double blinded randomized controlled study. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2014; 24(2):127-33

76. Biler A, Yucebilgin S, Sendag F, Akman L, Akdemir A, Ates A, Uyanikgil Y, Yilmaz-Dilsiz O, Sezer E. The effects of different

intraabdominal pressure protocols in laparoscopic procedures on oxidative stress markers and morphology in rat ovaries. *Adv Clin Exp Med*. 2014;23(6):885-92.

77. Hua J, Gong J, Yao L, et al. Review: Low-pressure versus standard-pressure pneumoperitoneum for laparoscopic cholecystectomy: a systematic review and meta-analysis. *Am J Surg*. 2014; 208(1): 143-50.

78. Blobner M, Frick CG, Stauble RB, Feussner H, Schaller SJ, Unterbuchner C, Lingg C, Geisler M, Fink H. Neuromuscular blockade improves surgical conditions (NISCO) *Surg Endosc*. 2015;29(3): 627-36.

79. Kontoulis TM, Pissas DG, Pavlidis TE, Pissas GC, Lalountas MA, Koliakos G, Topouridou K, Sakantamis AK. The oxidative effect of prolonged CO(2) pneumoperitoneum a comparative study in rats. *J Surg Res*. 2012; 175, 259–64.

80. Aran T, Unsal MA, Guven S, Kart C, Cetin EC, Alver A. Carbon dioxide pneumoperitoneum induces systemic oxidative stress: a clinical study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2012; 161(1): 80–3.

81. Yiannakopoulou E, Nikiteas N, Perrea D, Tsigris C. Minimally invasive surgery and oxidative stress response: what have we learned from animal studies? *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*. 2013; 23(1): 25-8.

82. Yoshino O, Quail A, Oldmeadow C. The interpretation of intra-abdominal pressures from animal models: The rabbit to human example *Injury*. *Int J Care Injured*. 2012; 43: 169–73.

83. Avital S, Refaeli AE, Szomstein AES. Correlation of CO₂ pneumoperitoneal pressures between rodents and humans. *Surg Endosc*.

2009; 23: 50-4.

84. Daphan CE, Agalar F, Hascelik G, Onat D, Sayek I. Effects of laparotomy, and carbon dioxide and air pneumoperitoneum, on cellular immunity and peritoneal host defences in rats. *Eur J Surg*. 1999; 165: 253-8.

85. Hanly EJ, Mendoza-Sagaon M, Murata K, Hardacre JM, De Maio A, Talamini MA. CO₂ Pneumoperitoneum modifies the inflammatory response to sepsis. *Ann Surg*. 2003; 237: 343-50.

86. Wispe JR, Warner BB, Clark JC, Dey CR, Neuman J, Glasser SW, Crapo JD, Chang LY, Whitsett JA. Human Mn-superoxide dismutase in pulmonary epithelial cells of transgenic mice confers protection from oxygen injury. *J Biol Chem*. 1992; 267: 23937-41.

87. Folz RJ, Abushamaa AM, Suliman HB. Extracellular superoxide dismutase in the airways of transgenic mice reduces inflammation and attenuates lung toxicity following hyperoxia. *J Clin Invest*. 1999; 103: 1055-66.

88. Min JH, Codipilly CN, Nasim S, Miller EJ, Ahmed MN. Synergistic protection against hyperoxia-induced lung injury by neutrophils blockade and EC-SOD overexpression. *Respir Res*. 2012; 13: 58.

89. Su CL, Du WY, Chiang LL. Amelioration of superoxide dismutase on ventilator-induced lung injury by suppressing leukocyte in the lungs and systemic circulation. *Chin J Physiol*. 2013; 56: 219-29.

90. Marklund SL. Expression of extracellular superoxide dismutase by human cell lines. *Biochem J*. 1990; 266: 213-9.

91. Folz RJ, Guan J, Seldin MF, Oury TD, Enghild JJ, Crapo JD. Mouse extracellular superoxide dismutase: primary structure, tissue-specific gene expression, chromosomal localization and lung in situ hybridization. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997; 17: 393-403.
92. Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide dismutase: site of synthesis and intramitochondrial localization. *J Biol Chem.* 1973; 248: 4793-6.
93. Choi E, Na S, Choi SH, An J, Rha KH, Oh YJ. Comparison of volume-controlled and pressure-controlled ventilation in steep Trendelenburg position for robot-assisted laparoscopic radical prostatectomy. *J Clin Anesth.* 2011; 23, 183–8.
94. Valenza F, Chevallard G, Fossali T. Management of mechanical ventilation during laparoscopic surgery. *Best Pract Res Clinl Anaesthesiol.* 2010; 24: 227–41.
95. Akoumianaki E, Maggiore SM, Valenza F. The application of esophageal pressure measurement in patients with respiratory failure. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014; 189: 520-31.
96. Carry PY, Gallet D, Francois Y, Perdriez JP, Sayag A, Gilly F, Ederhard A, Banssilon V, Baconnier P. Respiratory mechanics during laparoscopic cholecystectomy: the effects of the abdominal wall lift. *Anesth Analg* 1998; 87: 1393-7.

