

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
PEDIATRIA

FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM EMPIEMA

EXPERIMENTAL

VANESSA FELLER MARTHA

TESE DE DOUTORADO

Porto Alegre, Brasil 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS:
PEDIATRIA

FATOR DE NECROSE TUMORAL ALFA EM EMPIEMA

EXPERIMENTAL

VANESSA FELLER MARTHA

Orientador: José Carlos Soares de Fraga

“A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós- Graduação em Ciências Médicas: Pediatria, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor.”

Porto Alegre, Brasil 2008.

Agradecimentos

Ao meu orientador Dr. José Carlos Soares de Fraga, pela sabedoria, orientação, incentivo e confiança durante esta longa jornada.

Ao Dr. Sérgio Luis Amantéa, pelo incentivo, amizade, e disponibilidade que direcionam minhas atividades profissionais.

A Cristina Bonorino coordenadora do Laboratório de Imunoreumatologia do Instituto de Pesquisas Biomédica Hospital São Lucas da PUCRS, pelo entusiasmo, apoio e orientações durante a análise do FNT- α .

Ao professor Afonso Luis Barth chefe da Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas, pelo fornecimento das bactérias utilizadas e realização dos exames de cultura.

À Denise Pires Machado, pelo preparo das bactérias para inoculação.

Aos funcionários do Centro de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas pela ajuda durante o contato com os ratos.

À Fernanda Canani pela ajuda durante o experimento.

Ao GPPG pelo apoio técnico e ao FIPE pelo apoio financeiro ao projeto.

Ao Mathias Azevedo Bastian Bressel, pela análise estatística dos dados.

Aos colegas e amigos do Hospital Santo Antonio e Hospital Moinhos de Vento, por fazerem parte do meu cotidiano tornando as rotinas de trabalho momentos agradáveis.

Ao meu pai, que sempre me ensinou a acreditar no meu potencial e foi exemplo e responsável pela pessoa que sou hoje.

A toda a minha “grande” família por estimularem minha constante busca de novos desafios, acreditando e reforçando minhas conquistas e estando presente sempre que necessário.

Ao Arthur por, mesmo sendo pequeno, ter colaborado nos momentos em que me ausentei e sempre me receber com um sorriso maroto e de braços abertos.

Ao André, que serenamente aguarda seu momento de nascer permitindo que eu possa me dedicar com afinco a esta etapa final de um longo trabalho.

Ao Eduardo, por TUDO.

SUMÁRIO

I Lista de abreviaturas.....	7
II. Lista de figuras	8
III. Lista de tabelas em português	9
IV. Lista de tabelas em inglês	10
1. Introdução	12
2. Objetivos.....	15
2.1 Objetivo Geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos.....	15
3. Material e Métodos:.....	16
3.1. Linha de Pesquisa	16
3.2. Desenho.....	16
3.3. Local	16
3.4. População	16
3.5. Intervenção	16
3.6. Variáveis em estudo.....	17
3.6.1 Análise histopatológica	17
3.6.2. Cultura do líquido pleural e sangue	18
3.6.3. Dosagem do FNT-ó.....	18
3.7.Análise estatística	20

3.8. Implicações Éticas	21
4. Bibliografia	22
4. Artigo de Revisão	25
Empiema Pleural Experimental	26
Resumo.....	27
Introdução	28
História	28
Epidemiologia	30
Importância dos Modelos Experimentais	31
Desenvolvimento de Modelos Experimentais de Empiema	32
Empiema experimental em animais de pequeno porte	35
Conclusão	37
Referências Bibliográficas.....	38
5. Artigo Original em Português.....	41
6. Artigo Original em Inglês	55
7. Considerações Finais	70
8. Anexos	72

I LISTA DE ABREVIATURAS

<i>aC</i>	<i>antes de Cristo</i>
<i>BHI</i>	<i>caldo cérebro-coração</i>
<i>ELISA</i>	<i>enzyme-linked immunosorbent assays</i>
<i>EPP</i>	<i>efusão pleural parapneumônica</i>
<i>FNT- α</i>	<i>fator de necrose tumoral alfa</i>
<i>Gp</i>	<i>grupo</i>
<i>IC</i>	<i>intervalo de confiança</i>
<i>IQ</i>	<i>intervalo interquartil</i>
<i>Kg</i>	<i>kilograma</i>
<i>mg</i>	<i>miligrama</i>
<i>ml</i>	<i>mililitro</i>
<i>pg</i>	<i>picograma</i>
<i>SUS</i>	<i>Sistema Único de Saúde</i>
<i>VPP</i>	<i>valor preditivo positivo</i>
<i>VPN</i>	<i>valor preditivo negativo</i>

II. LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Toracocentese com abocath para inoculação da bactéria	73
Figura 2 Onda de pressão no espaço pleural.....	74
Figura 3 Monitor de pressão pleural.....	75
Figura 4 Câmara de CO ₂	76
Figura 5 Necrópsia em rato do grupo do <i>Streptococcus pneumoniae</i>	77
Figura 6 Necrópsia em rato do grupo do <i>Staphylococcus aureus</i>	78

III. LISTA DE TABELAS EM PORTUGUÊS

Tabela 1. Escala de reação pleural macroscópica	52
Tabela 2 Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) das concentrações de TNF- α (líquido pleural e no sangue) na discriminação de empiema.....	53
Tabela 3 Classificação da reação inflamatória pleural.....	54

IV. LISTA DE TABELAS EM INGLÊS

Table 1 Macroscopic scale of pleural reaction	67
Table 2 Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of TNF- α levels (in pleural fluid and in blood) for discrimination of empyema.....	68
Table 3 Classification of pleural inflammatory reaction.....	69

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

Empiema pleural é a presença de pus ou líquido com bactéria no espaço intrapleural. Sua presença aumenta a morbidade e a mortalidade associada à pneumonia em 6 a 10 % (Light 2006). Sob o ponto de vista clínico resulta em maior tempo de internação hospitalar, uso prolongado de antibióticos e necessidade de maior número de procedimentos cirúrgicos (Davies et al. 1999).

Na população pediátrica o manejo terapêutico das efusões pleurais parapneumônicas permanece controverso, não havendo consenso sobre o tipo de intervenção cirúrgica (toracotomia, uso de fibrinolítico ou toracoscopia) e, principalmente, sobre o momento da realização destes procedimentos (Doski et al. 2000; Thompson 1997). Portanto, o desenvolvimento de modelos experimentais constitui-se numa alternativa para melhor entendimento e manejo da doença pleural parapneumônica.

A maioria dos estudos experimentais de indução de empiema tem como ponto comum a necessidade de uma injúria pleural realizada previamente à inoculação bacteriana. São trabalhos realizados em porcos da índia ou coelhos, com necessidade de toracotomia e suporte ventilatório (Mavroudis et al. 1987; Mavroudis et al. 1985; Sahn et al. 1979).

O primeiro modelo de empiema induzido por toracocentese foi publicado por Sasse e colaboradores (Sasse et al. 1996) e utilizou coelhos inoculados com *Pasteurella multocida*. Strahilevitz e colaboradores induziram empiema por toracocentese em

coelhos, fazendo um preparo prévio da pleura com terebentina e posterior inoculação de *Streptococcus pneumoniae*(Strahilevitz et al. 2003)).

Em nosso meio, Tonietto e colaboradores(Tonietto et al. 1999) desenvolveram modelo de empiema em ratos após inoculação intrapleural de *Staphylococcus aureus*. A inoculação foi realizada após toracotomia, sem a necessidade de injúria prévia à pleura, mas com necessidade de intubação traqueal e ventilação mecânica dos animais. Utilizando técnica anestésica mais simples, sem necessidade de suporte ventilatório, Fraga e colaboradores(Fraga et al. 2001) obtiveram sucesso utilizando ratos com a mesma bactéria inoculada por toracocentese. Apesar de tecnicamente simples, o procedimento estava associado à dificuldade de estabelecer com segurança a localização intrapleural do inóculo. Mais recentemente, Schopf e colaboradores(Schopf et al. 2004) modificaram esta técnica, utilizando monitorização gráfica da pressão intrapleural por oscilometria digital. Tal procedimento possibilitou maior segurança para a localização correta da agulha no espaço intrapleural.

Apesar do êxito das técnicas experimentais descritas até o momento, não encontramos na literatura descrição da indução de empiema através de toracocentese em ratos utilizando como inóculo o *Streptococcus pneumoniae*, patógeno mais comumente encontrado nas efusões pleurais parapneumônicas na criança. Além disso, a determinação da melhor abordagem terapêutica dos derrames para pneumônicos é alvo de controvérsias. A identificação de fatores que possam preceder precocemente a evolução de uma efusão pleural parapneumônica para empiema tem sido buscada há muito tempo.

Na década de 50 surgem os primeiros estudos na tentativa de diferenciar as efusões pleurais, através de parâmetros bioquímicos(Chavalittamrong et al. 1979; Light et

al. 1980; Light and Rodriguez 1998; Potts et al. 1976; Potts et al. 1978; Sahn 1993; Taryle et al. 1978).

A partir dos anos 80, com o desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas, surgem trabalhos utilizando as citocinas na efusão pleural (Akarsu et al. 2005; Alexandrakis et al. 1999; Ceyhan et al. 2003; Cheng et al. 2000; Kelley 1990; Odeh et al. 2000; Orphanidou et al. 1996; Silva-Mejias et al. 1995; Xirouchaki et al. 2002).

As citocinas que apresentam uma função identificada na doença pulmonar são: o fator de crescimento derivado das plaquetas, a interleucina-1, o fator transformador de crescimento, fator de necrose tumoral alfa, interleucina 6 e a interleucina 8 (Balfour-Lynn et al. 2005; Kelley 1990; Kroegel and Antony 1997).

O FNT- α é uma citocina pró-inflamatória, importante na resposta inflamatória precoce, produzida principalmente por macrófagos e monócitos que vem sendo estudada em empiema pleural. (Aleman et al. 2003; Alexandrakis et al. 1999; Xirouchaki et al. 2002). Alguns estudos observaram associação entre elevações na concentração de FNT- α pleural e a presença de polimorfonucleares na efusão pleural e aumento das concentrações de FNT- α nos exsudatos. (Odeh et al. 2000; Alexandrakis et al. 2000)

Entretanto, questões específicas sobre variabilidades individuais, influências próprias de diferentes agentes etiológicos e antibioticoterapia prévia não foram ainda avaliadas. As citocinas abrem novas perspectivas para compreensão da gênese das efusões pleurais parapneumônicas com potencial utilidade no manejo clínico da situação.

Portanto, a análise do comportamento destas citocinas em um modelo animal reprodutível tem grande potencial para trazer novas evidências a assunto tão cheio de controvérsias.

2. Objetivos:

2.1. Geral

- Induzir empiema em ratos através da inoculação pleural de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* por toracocentese.

2.2. Específicos

- Determinar as concentrações sérica e pleural de FNT- α nos empiemas induzidos por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*.
- Identificar diferenças na concentração do FNT- α entre os empiemas induzidos por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*.
- Avaliar a capacidade de discriminação do FNT- α como teste diagnóstico na complicação das efusões pleurais.

3. Material e Métodos:

3.1. Linha de Pesquisa: Empiema pleural. Estudo desenvolvido dentro da referida linha de pesquisa, estabelecida desde o ano de 2000. Equipe de trabalho coordenada pelo Setor de Cirurgia Torácica Pediátrica do HCPA, em parceria com Serviço de Patologia do HCPA e Programa de Pós-Graduação em Farmacologia FFFCMPA.

3.2. Desenho: estudo experimental.

3.3. Local: Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre .

3.4. População: Ratos Wistar, com peso médio de 300 a 400g, obtidos aleatoriamente do mesmo criador.

3.5. Intervenção: Os ratos foram submetidos à inoculação intrapleural, por toracocentese, de 0,3 ml de 10^{10} unidades formadoras de colônias de *Streptococcus pneumoniae* ou *Staphylococcus aureus*, cultivadas em caldo cérebro-coração (BHI).

Os grupos foram constituídos de maneira seqüencial e divididos de acordo com a bactéria inoculada. Iniciamos o procedimento com a inoculação de *Staphylococcus aureus* (Grupo I), em função de experiência prévia dos pesquisadores com o modelo experimental utilizado(Schopf et al 2004). O grupo foi constituído por 17 animais. No grupo constituído pela inoculação de *Streptococcus pneumoniae* (Grupo II), optamos por

conduzir o experimento em blocos de cinco animais, visto que não possuíamos experiência prévia com a utilização deste inóculo. Programamos um número de 30 animais com o objetivo de validar o experimento.

Para realização da toracocentese os ratos foram anestesiados com xilasina 10mg/kg e quetamina 90mg/kg. Todos os animais foram posicionados em decúbito dorsal e puncionados no 4º espaço intercostal direito com abocath número 24 conectado a um oscilômetro de pressão digital desenvolvido pela Engenharia Biomédica do HCPA, já utilizado previamente para esta finalidade (Schopf et al 2004). A confirmação do sítio anatômico era obtida por medida de pressão intrapleural utilizando-se tal oscilômetro, que indicava quando a extremidade do cateter estava no espaço pleural.

A eutanásia dos animais foi realizada em câmara de CO₂, 72 horas após a inoculação no Grupo I, e 48 horas após a inoculação no Grupo II. Após tal procedimento, eram avaliados a presença de líquido livre ou pus no espaço pleural sob visualização direta, identificação bacteriológica do agente (líquido pleural e sangue), dosagem de FNT- α (líquido pleural e sangue) e descrição dos achados anatomopatológicos encontrados.

3.6. Variáveis em estudo:

3.6.1 Análise histopatológica:

Foi realizada biópsia de pleura e pulmão homo e contra lateral para análise histopatológica. As peças foram conservadas em formaldeído para posterior fixação em parafina. Após serem seccionadas eram coradas em hematoxilina/eosina e analisadas em microscópio óptico. Foram avaliadas para presença de infiltrado inflamatório, fibrina,

abcesso ou necrose. Além disso, foi realizada análise macroscópica para determinar a severidade da reação pleural, determinada pela intensidade da exsudação neutrofflica.

3.6.2. Cultura do líquido pleural e sangue

Realizada cultura do líquido pleural e sangue dos ratos de acordo com rotinas do laboratório de microbiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

3.6.3. Dosagem do FNT- α

A dosagem do FNT- α foi realizada através do método ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assays*) com kit OptEIA™ kit II para TNF- α Set (catálogo N° 550734I) do Laboratório Pharmingen, EUA, de acordo com as instruções do fabricante. Esse kit contém os componentes necessários para realizar a dosagem em soro, plasma e células sobrenadantes, e nível de detecção mínimo de 150pg/ml.

As dosagens do FNT- α no líquido pleural e no soro foram realizadas em duplicata como forma de controle de qualidade.

O material colhido foi descongelado em temperatura ambiente e o líquido diluído 1:1 com PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) 0,01 M pH 7,0 .

Os testes foram realizados nas seguintes etapas:

1. Toma-se uma placa Elisa que contém 96 poços identificados na horizontal com as letras A a H, e na vertical pelos números um a doze. É utilizada uma placa para a dosagem no líquido pleural e outra para a dosagem no soro. As placas de ELISA são sensibilizadas com 1ml por poço, de

anticorpo de captura (anticorpo monoclonal Anti-FTN- α humano) diluído em tampão (Carbonato 0,1M, 8,4g NaHCO₃, 3,56g Na₂CO₃; q.s. 1L; pH 9,5) e incubado a 4°C, em câmara úmida, durante toda a noite

2. Após a sensibilização, as placas são lavadas três vezes com 300ml de solução tampão PBS. Após a última lavagem, invertem-se as placas e as mesmas são colocadas sobre papel absorvente, para retirar quaisquer resíduos de tampão.
3. Os sítios são bloqueados com 200ml por poço, do diluente do ensaio, à temperatura ambiente, por uma hora.
4. É feita nova lavagem da placa com PBS por três vezes, como descrito acima.
5. São preparadas soluções para a curva padrão nas seguintes diluições: 7,8pg/ml, 15,6pg/ml, 31,2pg/ml, 62,5pg/ml, 125pg/ml, 250pg/ml e 500pg/ml.
6. Cem ml das soluções padrão e amostras são adicionados na placa em duplicatas, seguido de incubação por duas horas, em temperatura ambiente.
7. Após a incubação, a placa é aspirada e lavada por cinco vezes, conforme já descrito anteriormente.
8. Adiciona-se 100ml da solução com anticorpo detector (Anticorpo monoclonal anti-FNT- α de rato biotilado conjugado com Avidina-

peroxidase, AV-HRP) a cada orifício e mantém-se a placa em incubação por uma hora em temperatura ambiente.

9. É realizada nova sessão de lavagens com PBS, por sete vezes.
10. Acrescenta-se 100ml por poço, da solução de substrato (Tetrametilbenzidina e Peróxido de Hidrogênio) a cada orifício. A placa é incubada por mais 30 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz.
11. Após os 30 minutos são adicionados 50ml da solução bloqueadora (2 N H₂SO₄) a cada orifício. Neste momento, os orifícios com presença de FNT- α mostram uma coloração azul que muda instantaneamente para amarelo, com o acréscimo da solução bloqueadora .

O próximo passo é a leitura por espectrometria, no equipamento Benchmarck Microplate Reader BIO-RAD com filtro de 450 nm e a obtenção automática do valor da absorvância para cada poço. É calculada a média das leituras das duplicatas, tanto dos padrões como das amostras. A partir dos valores conhecidos das soluções padrões, determinadas pelo fabricante, é montada uma curva padrão. Através da análise de regressão linear, determina-se o valor desconhecido de FNT- α nas amostras.

3.7.Análise Estatística:

Os dados foram armazenados no programa Microsoft Excel 2000, e analisados através do pacote estatístico SPSS versão 12. As variáveis quantitativas simétricas foram expressas através de média e desvio-padrão, e as variáveis assimétricas através da mediana e amplitude interquartil (P₂₅ a P₇₅). Os dados categóricos foram expressos por

freqüências e percentagens. A análise inferencial foi realizada através do teste qui-quadrado, teste exato de Fisher e teste de McNemar. A significância dos testes estatísticos foi estabelecida em 95% ($p \leq 0,05$).

3.8. Implicações Éticas:

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Instituição e os animais tratados de acordo com o protocolo de cuidados com animais de laboratório, vigentes na resolução normativa 04/97.

4. Bibliografia

1. Akarsu, S., A. N. Kurt, Y. Dogan, E. Yilmaz, A. Godekmerdan, and A. D. Aygun. 2005. The differential diagnostic values of cytokine levels in pleural effusions. *Mediators Inflamm* 2005 (1):2-8.
2. Aleman, C., J. Alegre, J. Monasterio, R. M. Segura, L. Armadans, A. Angles, E. Varela, E. Ruiz, and T. Fernandez de Sevilla. 2003. Association between inflammatory mediators and the fibrinolysis system in infectious pleural effusions. *Clin Sci (Lond)* 105 (5):601-607.
3. Alexandrakis, M. G., S. A. Coulocheri, D. Bouros, and G. D. Eliopoulos. 1999. Evaluation of ferritin, interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha in the differentiation of exudates and transudates in pleural effusions. *Anticancer Res* 19 (4C):3607-3612.
4. Alexandrakis, M. G., S. A. Coulocheri, D. Bouros, K. Mandalaki, N. Karkavitsas, and G. D. Eliopoulos. 2000. Evaluation of inflammatory cytokines in malignant and benign pleural effusions. *Oncol Rep* 7 (6):1327-1332.
5. Balfour-Lynn, I. M., E. Abrahamson, G. Cohen, J. Hartley, S. King, D. Parikh, D. Spencer, A. H. Thomson, and D. Urquhart. 2005. BTS guidelines for the management of pleural infection in children. *Thorax* 60 Suppl 1:i1-21.
6. Ceyhan, B. B., E. Demiralp, Z. L. Karakurt, S. Karakurt, and M. Sungur. 2003. Transforming growth factor beta-1 level in pleural effusion. *Respirology* 8 (3):321-325.
7. Chavalittamrong, B., K. Angsusingha, M. Tuchinda, S. Habanananda, P. Pidatcha, and C. Tuchinda. 1979. Diagnostic significance of pH, lactic acid dehydrogenase, lactate and glucose in pleural fluid. *Respiration* 38 (2):112-120.
8. Cheng, D., Y. C. Lee, J. T. Rogers, E. A. Perrett, J. P. Moyers, R. M. Rodriguez, and R. W. Light. 2000. Vascular endothelial growth factor level correlates with transforming growth factor-beta isoform levels in pleural effusions. *Chest* 118 (6):1747-1753.
9. Davies, C. W., S. E. Kearney, F. V. Gleeson, and R. J. Davies. 1999. Predictors of outcome and long-term survival in patients with pleural infection. *Am J Respir Crit Care Med* 160 (5 Pt 1):1682-1687.
10. Doski, J. J., D. Lou, B. A. Hicks, S. M. Megison, P. Sanchez, M. Contidor, and P. C. Guzzetta, Jr. 2000. Management of parapneumonic collections in infants and children. *J Pediatr Surg* 35 (2):265-268; discussion 269-270.
11. Fraga, J. C., S. L. Amantea, and R. Argenta. 2001. Indução de empiema em ratos através da inoculação pleural de bactérias. *J Pediatr* 77:469-474.
12. Kelley, J. 1990. Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis* 141 (3):765-788.
13. Kroegel, C., and V. B. Antony. 1997. Immunobiology of pleural inflammation: potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. *Eur Respir J* 10 (10):2411-2418.
14. Light, R. W. 2006. Parapneumonic effusions and empyema. *Proc Am Thorac Soc* 3 (1):75-80.
15. Light, R. W., W. M. Girard, S. G. Jenkinson, and R. B. George. 1980. Parapneumonic effusions. *Am J Med* 69 (4):507-512.

16. Light, R. W., and R. M. Rodriguez. 1998. Management of parapneumonic effusions. *Clin Chest Med* 19 (2):373-382.
17. Mavroudis, C., B. L. Ganzel, S. K. Cox, and H. C. Polk, Jr. 1987. Experimental aerobic-anaerobic thoracic empyema in the guinea pig. *Ann Thorac Surg* 43 (3):298-302.
18. Mavroudis, C., B. L. Ganzel, S. Katzmark, and H. C. Polk, Jr. 1985. Effect of hemothorax on experimental empyema thoracis in the guinea pig. *J Thorac Cardiovasc Surg* 89 (1):42-49.
19. Odeh, M., E. Sabo, I. Srugo, and A. Oliven. 2000. Tumour necrosis factor alpha in the diagnostic assessment of pleural effusion. *Qjm* 93 (12):819-824.
20. Orphanidou, D., M. Gaga, A. Rasidakis, K. Dimakou, M. Toumbis, P. Latsi, J. Pandalos, J. Christacopoulou, and J. Jordanoglou. 1996. Tumour necrosis factor, interleukin-1 and adenosine deaminase in tuberculous pleural effusion. *Respir Med* 90 (2):95-98.
21. Potts, D. E., D. C. Levin, and S. A. Sahn. 1976. Pleural fluid pH in parapneumonic effusions. *Chest* 70 (03):328-331.
22. Potts, D. E., D. A. Taryle, and S. A. Sahn. 1978. The glucose-pH relationship in parapneumonic effusions. *Arch Intern Med* 138 (9):1378-1380.
23. Sahn, S. A. 1993. Management of complicated parapneumonic effusions. *Am Rev Respir Dis* 148 (3):813-817.
24. Sahn, S. A., D. A. Taryle, and J. T. Good, Jr. 1979. Experimental empyema. Time course and pathogenesis of pleural fluid acidosis and low pleural fluid glucose. *Am Rev Respir Dis* 120 (2):355-361.
25. Sasse, S. A., L. A. Causing, M. E. Mulligan, and R. W. Light. 1996. Serial pleural fluid analysis in a new experimental model of empyema. *Chest* 109 (4):1043-1048.
26. Schopf, L. F., J. C. Fraga, S. L. Amantea, P. Sanches, A. Muller, S. Borowski, J. Kulczynski, and E. Costa. 2004. Induction of pleural empyema in rats by thoracentesis with intrapleural pressure monitoring. *Pediatr Surg Int* 20 (7):515-519.
27. Silva-Mejias, C., F. Gamboa-Antinolo, L. F. Lopez-Cortes, M. Cruz-Ruiz, and J. Pachon. 1995. Interleukin-1 beta in pleural fluids of different etiologies. Its role as inflammatory mediator in empyema. *Chest* 108 (4):942-945.
28. Strahilevitz, J., A. Lev, I. Levi, E. Fridman, and E. Rubinstein. 2003. Experimental pneumococcal pleural empyema model: the effect of moxifloxacin. *J Antimicrob Chemother* 51 (3):665-669.
29. Taryle, D. A., D. E. Potts, and S. A. Sahn. 1978. The incidence and clinical correlates of parapneumonic effusions in pneumococcal pneumonia. *Chest* 74 (2):170-173.
30. Thompson, W. 1997. Pleural effusion and empyema. In *Pediatric Intensive Care*, edited by F. M. DL Levin 387-390.
31. Tonietto, T., E. Pilla, G. Madke, U. Silva, J. Felicetti, J. Camargo, M. Cardoso, R. Nonnig, and P. Cardoso. 1999. Empiema pleural experimental em ratos: avaliação dos efeitos do uso intrapleural de Dextran-40 na fase fibrinopurulenta. *J Pneumol* 25:147-152.

32. Xirouchaki, N., N. Tzanakis, D. Bouros, D. Kyriakou, N. Karkavitsas, M. Alexandrakis, and N. M. Siafakas. 2002. Diagnostic value of interleukin-1alpha, interleukin-6, and tumor necrosis factor in pleural effusions. *Chest* 121 (3):815-820.

4. Artigo de Revisão

Empiema Pleural Experimental

Vanessa Feller Martha, José Carlos Fraga, Sérgio Luis Amantéa.

Vanessa Feller Martha

Pediatra Intensivista. Médica da Emergência do Hospital Santo Antonio e da Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica do Hospital Moinhos de Vento de Porto Alegre, Brasil.

Jose Carlos Fraga

Professor Associado do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Cirurgião Pediátrico Chefe do Serviço de Cirurgia Pediátrica e Cirurgião do Setor de Cirurgia Torácica Infantil do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Pesquisador do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, Porto Alegre, Brasil.

Sérgio Luis Amantéa

Professor Adjunto do Departamento de Pediatria da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Pneumologista Pediátrico Chefe da Emergência do Hospital Santo Antonio de Porto Alegre, Brasil.

Resumo

Introdução: O tratamento cirúrgico da efusão pleural parapneumônica é controverso. Está basicamente fundamentado na experiência pessoal e em trabalhos em geral retrospectivos e com amostras pequenas. Modelos experimentais vêm sendo desenvolvidos numa tentativa de buscar numa população com características controladas, um maior entendimento acerca das efusões pleurais parapneumônicas.

Objetivo: O objetivo deste artigo é apresentar uma revisão bibliográfica dos principais trabalhos de modelo experimental de empiema.

Fonte de dados: Foram utilizados dados de artigos científicos pesquisados através dos bancos de dados Medline e Lilacs.

Síntese dos dados: Os primeiros modelos experimentais de empiema foram realizados em porcos da índia e coelhos. Para obter êxito na indução, era realizada uma injúria prévia à pleura, como hemotórax ou introdução de um corpo estranho como a fita de terebentina. Posteriormente, foi desenvolvida técnica que aumentava a virulência da bactéria, descartando a necessidade de injúria prévia. A partir de então, foram desenvolvidos modelos com técnicas mais simples, como a toracocentese com anestesia superficial, para indução de empiema. Dentro desta linha foram desenvolvidos modelos que utilizam a inoculação de bactérias em ratos através de toracocentese guiada por monitor de pressão digital.

Conclusão: A evolução no desenvolvimento dos modelos experimentais de empiema evidencia modelos com técnicas mais simples, como a toracocentese, sem necessidade de injúria prévia à pleura e em animais de pequeno porte.

Introdução

História

Embora a primeira descrição de infecção pleural tenha sido feita pelo médico egípcio Imhotep em torno do ano 3000 antes de Cristo (a.C.), os relatos iniciais mais famosos são os de Hipócrates no ano 500 a.C. (1).

Hipócrates identificava qual era o lado afetado pela presença de uma elevação na parede torácica ou ao sacudir o paciente. Ao identificar os pacientes com derrame pleural, sugeria o tratamento com drenagem aberta e constatava que o prognóstico do doente dependia das características do fluido (2-4).

No século XVIII Auenbrugger apresentou a técnica de percussão para o diagnóstico de líquido pleural, que foi ignorada até 1806, quando Corvisart mostrou a sua utilidade junto com a ausculta diretamente no tórax (2, 5). Uma década após, Laënnec criou o estetoscópio, que começou a ser vendido a partir de 1834, na Inglaterra (5).

Drenagem aberta do tórax era o único tratamento preconizado até o século XIX, quando tubo de drenagem torácica foi pela primeira vez descrito, mas não adotado (6). Hewitt em 1876 descreveu o método de realizar drenagem fechada da parede torácica com um tubo de borracha que foi colocado no interior da cavidade com empiema, através de uma cânula (4). Neste período Trousseau na França e Bowditch nos Estados Unidos popularizaram o uso de toracocentese e demonstraram que a drenagem aberta não era necessária em muitos casos (2, 4).

Em 1896, Paget enfatizou que a drenagem aberta para empiema não podia ser instituída antes de 15 dias de evolução da doença. Na primeira Guerra Mundial, a drenagem aberta se tornou aceita como tratamento em todos os casos de efusão

parapneumônica. Neste período houve um aumento de incidência de efusão nos soldados Americanos e o tratamento de todos os pacientes com drenagem aberta apresentava prognóstico ruim (4).

A técnica do dreno de tórax foi amplamente praticada durante uma epidemia de influenza entre 1917 e 1919 quando a drenagem cirúrgica aberta foi associada com uma taxa de mortalidade de até 70% (7). Esta elevada mortalidade estava provavelmente associada à falência respiratória por extenso pneumotórax decorrente da drenagem aberta. A infecção por *Streptococcus hemolyticus* (o qual produzia streptokinase e provavelmente reduzia a formação de adesões) era a responsável pela maioria dos casos de mortalidade pois esse organismo causava uma grande efusão pleural não loculada (4, 7).

Foi então que uma comissão militar americana (*Empyema Comission*), fundada por Evarts Graham, investigou a elevada mortalidade e escreveu recomendações que servem de base para o tratamento atual da efusão pleural parapneumônica até os dias de hoje (2, 4). Eles consideraram adequada a drenagem fechada de pus por dreno de tórax (evitando a drenagem aberta precoce), obliteração do espaço pleural e suporte nutricional competente. Com estas normas a mortalidade por empiema reduziu para 4,3% nos estágios finais da epidemia (8).

A primeira radiografia impressa foi realizada no ano 1895 pelo médico Roentgen em Viena e a primeira radiografia de tórax em 1896. Somente em 1945 a *Royal Society of Medicine* na Inglaterra concluiu que a radiografia era superior a ausculta com estetoscópio para o diagnóstico de efusão pleural (2, 5).

As bactérias tiveram a sua presença identificada no empiema a partir de 1882. Acredita-se que seriam secundárias a uma contaminação da cirurgia aberta previamente realizada na pleura. Mas foi somente em 1929 que Alexander Fleming descobriu a utilidade terapêutica da penicilina, e com o desenvolvimento desta droga ocorreu uma melhora no prognóstico dos pacientes com efusão pleural (2, 9).

Na década de 50 surgem os primeiros estudos na tentativa de diferenciar as efusões pleurais, através de parâmetros bioquímicos (4, 10-15). Em 1979 (10), Chavalittamrong e colaboradores demonstraram a aplicabilidade das análises bioquímicas na efusão pleural na população pediátrica (10).

A partir dos anos 80, com o desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas, surgem trabalhos analisando o comportamento das citocinas na efusão pleural (16-25).

Epidemiologia

A efusão pleural parapneumônica é o acúmulo de líquido pleural exsudativo associado a uma infecção pulmonar ipsilateral (pneumonia bacteriana, abscesso pulmonar, ou bronquiectasias) (26-30).

Dependendo das técnicas laboratoriais empregadas e dos critérios diagnósticos considerados o derrame pleural pode ocorrer em até 44% das pneumonias adquiridas na comunidade. Em aproximadamente 10% destes pacientes, existirá a necessidade de tratamento intervencionista (toracotomia), considerando a efusão como parapneumônica complicada ou empiema (31). Empiema é o termo de origem grega que significa acúmulo de pus em cavidade corporal, órgão ou espaço do organismo (32). Quando ocorre na cavidade torácica é chamado empiema torácico.

A presença de empiema associado a uma pneumonia aumenta a morbidade e mortalidade da doença em 6 a 10% e prolonga a permanência hospitalar (31, 33). A taxa de mortalidade em crianças com empiema ainda é alta (6-12%), apesar de todos os avanços relacionados à assistência médica intensiva (29).

Segundo os dados do DATA-SUS, na faixa etária pediátrica (até 14 anos), no ano de 2005, houveram 403.219 internações no Brasil por pneumonia, com 2.050.415 dias de internação e um total de 1.889 óbitos, sendo que a taxa de mortalidade foi de 0,47. Essas internações geraram um custo de aproximadamente R\$ 200.000.000,00 por ano. Esses dados são referentes apenas ao Sistema Único de Saúde (SUS), não sendo computados os gastos dos planos de saúde, além dos pacientes que não necessitaram internação hospitalar e realizaram tratamento domiciliar (34).

Importância dos Modelos Experimentais

Até o momento, a literatura não foi capaz de apresentar subsídios científicos e casuísticas capazes de fundamentar a melhor conduta a ser estabelecida nas efusões pleurais parapneumônicas. (35, 36). Além disso, estudos que comparam tratamento da efusão pleural parapneumônica são, em geral, estudos retrospectivos, com populações heterogêneas, sem randomização e com número de pacientes insuficiente para um julgamento adequado. A falta de trabalhos prospectivos, randomizados e com número adequado de pacientes é um dos principais obstáculos para definir o tratamento clínico e cirúrgico ideal do empiema. (37).

Apesar de todos os avanços para entender o processo de desenvolvimento e microbiologia da infecção pleural, o tratamento ainda é baseado em princípios

estabelecidos há 100 anos atrás (1). Os protocolos de tratamento para empiema propostos na literatura são diversos e variam de antibioticoterapia isolada à toracotomia aberta com transposição muscular e irrigação pleural com trombolíticos (38-41)

Alguns centros de pesquisa procuraram desenvolver modelos experimentais viáveis, para que pudessem buscar numa população com características controladas, um maior entendimento acerca das efusões pleurais parapneumônicas. A reprodução experimental do empiema apresenta importantes obstáculos. Estes podem estar relacionados à morte precoce dos animais ou até uma total ausência de empiema ou doença devido à variabilidade na capacidade dos animais em absorver o patógeno (42).

A criação de um modelo experimental de empiema torácico possibilita a avaliação detalhada das diferentes modalidades terapêuticas. O modelo experimental preferencialmente, deve ser simples, barato e de fácil reprodutibilidade.

Desenvolvimento de Modelos Experimentais de Empiema

A formação de um empiema resulta de uma complicada interação entre agentes e mecanismos de defesa do hospedeiro (1). Dados iniciais de modelos experimentais para indução de empiema sugeriam que a inoculação direta de material infectado em um espaço pleural seco resultaria em sepse ou recuperação completa do animal ao invés de formação de empiema (43).

Em um dos primeiros modelos experimentais de empiema e que serviu de base para o desenvolvimento de outros estudos, utilizava-se de uma agressão à pleura através da injeção de terebentina no espaço pleural levando a formação de uma efusão pleural estéril na qual a bactéria era posteriormente injetada (44). Mais tarde foi observado que o

uso de terebentina poderia alterar os parâmetros químicos do líquido pleural, o que poderia influenciar a adoção de medidas terapêuticas embasadas pela análise do líquido (45).

Outros modelos experimentais conduziam a indução do empiema pela introdução de corpo estranho contendo bactérias no espaço pleural, ou pela geração prévia de hemotórax para posterior inoculação de agente bacteriano (46, 47).

Mavroudis e colaboradores (47), induziram empiema em porcos da Índia através da inoculação de vários agentes bacterianos (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Bacteroides fragilis*). Os animais (n=30) foram distribuídos em três grupos experimentais. Empiema foi observado em 58% dos animais no grupo *Staphylococcus aureus*, 37% no grupo *Escherichia coli* e não obtiveram êxito na indução de empiema no grupo *Bacteroides fragilis*. Seu objetivo principal não estava centrado na análise exclusiva do empiema, mas na avaliação do seu comportamento na presença de hemotórax (47).

Sahn e colaboradores (44), inicialmente tentaram induzir empiema em coelhos com a inoculação de *Bacteroides fragilis*, *Streptococcus intermedius*, or *Peptostreptococcus* injetados de maneira isolada ou em associação. Não obtiveram êxito, visto que os coelhos conseguiam fazer a eliminação das bactérias do espaço pleural sem o desenvolvimento de empiema. Posteriormente tentaram criar no modelo um ambiente predisponente para melhor crescimento bacteriano (talco, óleo mineral ou um sobrenadante de *Escherichia coli*). Novamente não obtiveram sucesso, embora tenham encontrado uma maior ocorrência de aderências no espaço pleural (48).

Nova tentativa foi feita buscando aumentar a virulência do inócuo para coelhos a partir de estudos envolvendo ratos no qual a *Pasteurella multocida* em caldo nutritivo de ágar desenvolveu abscesso peritoneal. O caldo nutritivo de ágar retém as bactérias no meio onde são introduzidas. Então *Pasteurella multocida* em caldo nutritivo de ágar foi injetada no espaço pleural. Todos os coelhos que receberam a *Pasteurella multocida* com ágar morreram em 7 dias com infecção purulenta espessa no espaço pleural, sinais de sepse e em muitos foi encontrado perfuração do colon na autopsia. Fundamentado por tais achados, os pesquisadores começaram a administrar doses diárias de penicilina parenteral o que limitou a infecção ao espaço pleural e permitiu que os animais vivessem por mais tempo (48).

Então, Sasse e colaboradores (45) publicaram um modelo experimental de indução de empiema em coelhos através da inoculação pleural por toracocentese de *Pasteurella multocida* em ágar. Neste modelo, era realizada uma pequena incisão torácica para introdução de um cateter conectado a um osciloscópio digital (monitor de pressão) confirmando a posição do cateter no espaço intrapleural. Era então aspirado o ar do espaço intrapleural e injetado 2ml caldo cérebro-coração (BHI) contendo *Pasteurella multocida* juntamente com ágar. A inoculação era seguida de uma infusão de 0,5 ml de soro fisiológico e o cateter retirado do espaço com aspiração de ar intrapleural. Posteriormente os coelhos recebiam analgésicos e penicilina intramuscular a partir de 24 horas do procedimento. Após 12, 24, 48, 72 e 96 horas da inoculação 2 ml de líquido pleural eram aspirados com uma agulha 19 Gauge (45).

O modelo experimental de empiema desenvolvido por Sasse apresentou vantagens em relação aos modelos anteriormente desenvolvidos, pois não era necessária

uma injúria pleural prévia ou a inoculação prévia de um corpo estranho no espaço pleural.

Apesar de o referido modelo ser o que melhor mimetizou empiema de seres humanos, ele apresenta algumas dificuldades de ordem técnica para ser reproduzido como modelo animal em laboratórios menos especializados. Os próprios cuidados de pós-operatório e a utilização de coelhos para o experimento dificultam sua aplicação.

Empiema experimental em animais de pequeno porte

Strahilevitz e colaboradores (49) salientaram a dificuldade de induzir empiema, mesmo em animais de porte maior, utilizando várias cepas de *Streptococcus pneumoniae*. Os mesmos autores referem também a impossibilidade de indução experimental de empiema em ratos e camundongos, a qual foi justificada por características anatômicas destes roedores. A ausência de separação das duas cavidades pleurais, associada a uma necessidade de injúria pulmonar prévia, resultaria em pneumotórax, levando a morte do animal antes do desenvolvimento de empiema (49).

Tonietto e colaboradores (42) foram os primeiros a contrariar tais afirmações. Buscando um modelo mais simples, conseguiram a indução de empiema em ratos, através da inoculação intrapleural de 1ml/Kg de solução contendo *Staphylococcus aureus* (10^{10} células/ml) diluído em caldo cérebro-coração (BHI). A bactéria foi isolada e cultivada a partir da mucosa oral do rato e inoculada após toracotomia com o animal anestesiado, sob intubação traqueal em ventilação mecânica. Foram submetidos à toracotomia sob anestesia inalatória 54 animais e destes 30 morreram por sepse antes do período de avaliação (42).

Apesar deste estudo ter sido realizado em ratos (animal ideal para experimentação em nosso meio devido ao baixo custo, facilidade de manuseio e de manutenção), a técnica empregada foi muito sofisticada, com a necessidade de intubação traqueal e anestesia inalatória do animal durante o procedimento cirúrgico. Além do mais, o número de animais que não conseguiram concluir o experimento por óbito precoce, foi muito significativo e provavelmente relacionado à instrumentação realizada.

Partindo deste modelo, Fraga e colaboradores (50), introduziram algumas modificações a técnica original e conseguiram induzir empiema em ratos com anestesia superficial e inoculação de bactérias por toracocentese, ao invés de toracotomia. Não tiveram perdas no experimento por óbito precoce, não necessitaram de injúria pleural prévia e a totalidade dos animais inoculados com *Staphylococcus aureus* (10^{10} células/ml) diluído em caldo cérebro-coração (BHI) produziram empiema. Em contrapartida, não conseguiram com a mesma técnica induzir empiema com *Pasteurella multocida* (50).

Mais recentemente, o mesmo grupo de pesquisa introduziu algumas modificações à técnica original e passou a guiar o procedimento de toracocentese por monitorização da pressão intrapleural, com equipamento especificamente desenvolvido para este objetivo. Obtiveram êxito na indução de empiema em 40 ratos, com perda mínima de animais. Além da produção de líquido pleural e cultivo da bactéria em todos os espécimes, demonstraram características anatomopatológicas compatíveis com estágio fibrinopurulento da efusão (51).

Tais estudos além de contrariar as observações de Strahilevitz (49) confirmam a possibilidade de indução de empiema por toracocentese em ratos e demonstram ausência da necessidade de qualquer injúria prévia da pleura para sucesso do modelo.

Até o momento nenhum estudo desenvolvido em pequenos animais havia conseguido induzir empiema com *Streptococcus pneumoniae*. Nosso estudo é pioneiro em tal proposta, mostrando que com a técnica de toracocentese guiada por oscilometria digital o desenvolvimento de empiema através da inoculação desta bactéria é possível.

Conclusão

Os modelos experimentais de empiema vêm evoluindo na tentativa de simplificar a técnica de indução e facilitar sua reprodução. A busca de modelos com animais de pequeno porte é um exemplo disso. A possibilidade de induzir empiema por *Streptococcus pneumoniae* em ratos, através de toracocentese, sem a necessidade de uma injúria prévia à pleura abre novas perspectivas para a compreensão de aspectos relacionados à resposta inflamatória deste patógeno, bem como a possibilidade de avaliação de propostas terapêuticas através deste modelo experimental.

Referências Bibliográficas

1. Rahman NM, Chapman SJ, Davies RJ. The approach to the patient with a parapneumonic effusion. *Clin Chest Med*. 2006 Jun;27(2):253-66.
2. History of Biomedicine. [cited 2006]; Available from: http://www.umanitoba.ca/faculties/medicine/units/medical_humanities/history/notes/surgery/index.html.
3. Cameron RJ. Management of complicated parapneumonic effusions and thoracic empyema. *Intern Med J*. 2002 Aug;32(8):408-14.
4. Light RW, Rodriguez RM. Management of parapneumonic effusions. *Clin Chest Med*. 1998 Jun;19(2):373-82.
5. Warren CP. The history of diagnostic technology for diseases of the lungs. *Cmaj*. 1999 Nov 2;161(9):1161-3.
6. Meyer JA. Gotthard Bulau and closed water-seal drainage for empyema, 1875-1891. *Ann Thorac Surg*. 1989 Oct;48(4):597-9.
7. Peters RM. Empyema thoracis: historical perspective. *Ann Thorac Surg*. 1989 Aug;48(2):306-8.
8. Davies CW, Gleeson FV, Davies RJ. BTS guidelines for the management of pleural infection. *Thorax*. 2003 May;58 Suppl 2:ii18-28.
9. Moellering Jr RC EG. Principles of Anti-infective Therapy. In: GL Mandell JB, BR Dolin, editor. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. Florida: W.B. Saunders Company; 2005. p. 242-53.
10. Chavalittamrong B, Angsusingha K, Tuchinda M, Habanananda S, Pidatcha P, Tuchinda C. Diagnostic significance of pH, lactic acid dehydrogenase, lactate and glucose in pleural fluid. *Respiration*. 1979;38(2):112-20.
11. Light RW, Girard WM, Jenkinson SG, George RB. Parapneumonic effusions. *Am J Med*. 1980 Oct;69(4):507-12.
12. Potts DE, Levin DC, Sahn SA. Pleural fluid pH in parapneumonic effusions. *Chest*. 1976 Sep;70(03):328-31.
13. Potts DE, Taryle DA, Sahn SA. The glucose-pH relationship in parapneumonic effusions. *Arch Intern Med*. 1978 Sep;138(9):1378-80.
14. Sahn SA. Management of complicated parapneumonic effusions. *Am Rev Respir Dis*. 1993 Sep;148(3):813-17.
15. Taryle DA, Potts DE, Sahn SA. The incidence and clinical correlates of parapneumonic effusions in pneumococcal pneumonia. *Chest*. 1978 Aug;74(2):170-3.
16. Akarsu S, Kurt AN, Dogan Y, Yilmaz E, Godekmerdan A, Aygun AD. The differential diagnostic values of cytokine levels in pleural effusions. *Mediators Inflamm*. 2005 Feb 24;2005(1):2-8.
17. Alexandrakis MG, Coulocheri SA, Bouros D, Eliopoulos GD. Evaluation of ferritin, interleukin-6, interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha in the differentiation of exudates and transudates in pleural effusions. *Anticancer Res*. 1999 Jul-Aug;19(4C):3607-12.
18. Alexandrakis MG, Coulocheri SA, Bouros D, Mandalaki K, Karkavitsas N, Eliopoulos GD. Evaluation of inflammatory cytokines in malignant and benign pleural effusions. *Oncol Rep*. 2000 Nov-Dec;7(6):1327-32.

19. Ceyhan BB, Demiralp E, Karakurt ZL, Karakurt S, Sungur M. Transforming growth factor beta-1 level in pleural effusion. *Respirology*. 2003 Sep;8(3):321-5.
20. Cheng D, Lee YC, Rogers JT, Perkett EA, Moyers JP, Rodriguez RM, et al. Vascular endothelial growth factor level correlates with transforming growth factor-beta isoform levels in pleural effusions. *Chest*. 2000 Dec;118(6):1747-53.
21. Kelley J. Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis*. 1990 Mar;141(3):765-88.
22. Odeh M, Sabo E, Srugo I, Oliven A. Tumour necrosis factor alpha in the diagnostic assessment of pleural effusion. *Qjm*. 2000 Dec;93(12):819-24.
23. Orphanidou D, Gaga M, Rasidakis A, Dimakou K, Toumbis M, Latsi P, et al. Tumour necrosis factor, interleukin-1 and adenosine deaminase in tuberculous pleural effusion. *Respir Med*. 1996 Feb;90(2):95-8.
24. Silva-Mejias C, Gamboa-Antinolo F, Lopez-Cortes LF, Cruz-Ruiz M, Pachon J. Interleukin-1 beta in pleural fluids of different etiologies. Its role as inflammatory mediator in empyema. *Chest*. 1995 Oct;108(4):942-5.
25. Xirouchaki N, Tzanakis N, Bouros D, Kyriakou D, Karkavitsas N, Alexandrakis M, et al. Diagnostic value of interleukin-1alpha, interleukin-6, and tumor necrosis factor in pleural effusions. *Chest*. 2002 Mar;121(3):815-20.
26. Alkrinawi S, Chernick V. Pleural infection in children. *Semin Respir Infect*. 1996 Sep;11(3):148-54.
27. Balfour-Lynn IM, Abrahamson E, Cohen G, Hartley J, King S, Parikh D, et al. BTS guidelines for the management of pleural infection in children. *Thorax*. 2005 Feb;60 Suppl 1:i1-21.
28. Hamm H, Light RW. Parapneumonic effusion and empyema. *Eur Respir J*. 1997 May;10(5):1150-6.
29. Lewis KT, Bukstein DA. Parapneumonic empyema in children: diagnosis and management. *Am Fam Physician*. 1992 Nov;46(5):1443-55.
30. Munglani R, Kenney IJ. Paediatric parapneumonic effusions: a review of 16 cases. *Respir Med*. 1991 Mar;85(2):117-9.
31. Davies CW, Kearney SE, Gleeson FV, Davies RJ. Predictors of outcome and long-term survival in patients with pleural infection. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Nov;160(5 Pt 1):1682-7.
32. Steven SM. Parapneumonic Effusions: pathophysiology, diagnosis and management. *American College of Chest Pain*. 1997;112:1-10.
33. Light RW. Parapneumonic effusions and empyema. *Proc Am Thorac Soc*. 2006;3(1):75-80.
34. DataSUS. Tecnologia da Informação a Serviço do SUS. 2006 [updated 2006; cited 5/9/2006]; Available from: <http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>.
35. Doski JJ, Lou D, Hicks BA, Megison SM, Sanchez P, Contidor M, et al. Management of parapneumonic collections in infants and children. *J Pediatr Surg*. 2000 Feb;35(2):265-8; discussion 9-70.
36. Thompson W. Pleural effusion and empyema. In: DL Levin FM, editor. *Pediatric Intensive Care*. 2 ed; 1997. p. 387-90.
37. Sasse S, Nguyen TK, Mulligan M, Wang NS, Mahutte CK, Light RW. The effects of early chest tube placement on empyema resolution. *Chest*. 1997 Jun;111(6):1679-83.
38. Berger HA, Morganroth ML. Immediate drainage is not required for all patients with complicated parapneumonic effusions. *Chest*. 1990 Mar;97(3):731-5.

39. Hakim M, Milstein BB. Empyema thoracis and infected pneumonectomy space: case for cyclical irrigation. *Ann Thorac Surg.* 1986 Jan;41(1):85-8.
40. Lee KS, Im JG, Kim YH, Hwang SH, Bae WK, Lee BH. Treatment of thoracic multiloculated empyemas with intracavitary urokinase: a prospective study. *Radiology.* 1991 Jun;179(3):771-5.
41. Lemmer JH, Botham MJ, Orringer MB. Modern management of adult thoracic empyema. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1985 Dec;90(6):849-55.
42. Tonietto T, Pilla E, Madke G, Silva U, Felicetti J, Camargo J, et al. Empiema pleural experimental em ratos: avaliação dos efeitos do uso intrapleural de Dextran-40 na fase fibrinopurulenta. *J Pneumol.* 1999;25:147-52.
43. Sahn SA, Taryle DA, Good JT, Jr. Experimental empyema. Time course and pathogenesis of pleural fluid acidosis and low pleural fluid glucose. *Am Rev Respir Dis.* 1979 Aug;120(2):355-61.
44. Sahn SA, Potts DE. Turpentine pleurisy in rabbits: a model of pleural fluid acidosis and low pleural fluid glucose. *Am Rev Respir Dis.* 1978 Nov;118(5):893-901.
45. Sasse SA, Causing LA, Mulligan ME, Light RW. Serial pleural fluid analysis in a new experimental model of empyema. *Chest.* 1996 Apr;109(4):1043-8.
46. Mavroudis C, Ganzel BL, Cox SK, Polk HC, Jr. Experimental aerobic-anaerobic thoracic empyema in the guinea pig. *Ann Thorac Surg.* 1987 Mar;43(3):298-302.
47. Mavroudis C, Ganzel BL, Katzmark S, Polk HC, Jr. Effect of hemothorax on experimental empyema thoracis in the guinea pig. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1985 Jan;89(1):42-9.
48. Sahn SA. Use of fibrinolytic agents in the management of complicated parapneumonic effusions and empyemas. *Thorax.* 1998 Aug;53 Suppl 2:S65-72.
49. Strahilevitz J, Lev A, Levi I, Fridman E, Rubinstein E. Experimental pneumococcal pleural empyema model: the effect of moxifloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Mar;51(3):665-9.
50. Fraga J, Amantéa S, Argenta R, Moura L, Nuch C, Borowski S. Indução de empiema em ratos através da inoculação pleural de bactérias. *J Pediatr.* 2001;77:469-74.
51. Schopf LF, Fraga JC, Amantea SL, Sanches P, Muller A, Borowski S, et al. Induction of pleural empyema in rats by thoracentesis with intrapleural pressure monitoring. *Pediatr Surg Int.* 2004 Jul;20(7):515-9.

5. Artigo Original em Português

Fator de necrose tumoral alfa em empiema torácico experimental *

Vanessa Feller Martha, José Carlos Fraga, Sérgio Luis Amantéa,
Paulo Sanches, Jane Kulczynski, Denise P Machado, Fernanda Canani.

* Estudo realizado no Setor de Cirurgia Torácica Infantil/Serviço de Cirurgia Pediátrica e Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com apoio financeiro do Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE) do HCPA.

Vanessa Feller Martha

Pediatra Intensivista. Médica da Emergência do Hospital Santo Antonio e da Unidade de Terapia Intensiva Pediátrica do Hospital Moinhos de Vento de Porto Alegre, Brasil.

Jose Carlos Fraga

Professor Associado do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Cirurgião Pediátrico Chefe do Serviço de Cirurgia Pediátrica e Cirurgião do Setor de Cirurgia Torácica Infantil do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). Pesquisador do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, Porto Alegre, Brasil.

Sérgio Luis Amantéa

Professor Adjunto do Departamento de Pediatria da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Pneumologista Pediátrico Chefe da Emergência do Hospital Santo Antonio de Porto Alegre, Brasil.

Paulo Sanches

Engenheiro do Departamento de Engenharia Biomédica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brasil.

Jane Kulczynski

Professora Adjunta do Departamento de Patologia da UFRGS. Patologista do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

Denise P Machado

Farmacêutica Bioquímica da Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

Fernanda Canani

Aluna (doutoranda) da Faculdade de Medicina da UFRGS. Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

Resumo:

Introdução: O manejo das efusões pleurais parapneumônicas (EPP) é controverso. A dosagem do fator de necrose tumoral alfa (FNT- α) no EPP tem sido estudado para diferenciar derrame pleural parapneumônico complicado do não complicado. A análise do FNT- α em um modelo experimental de empiema pode determinar a utilidade da dosagem desta citocina em EPP.

Objetivos: Induzir empiema através da inoculação pleural de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, dosar a concentração sérica e pleural de FNT- α e determinar se há diferença entre os empiemas induzidos por estas bactérias.

Métodos: Ratos Wistar (peso 300-400g) foram anestesiados e puncionados no 4º espaço intercostal direito para inoculação intrapleural de *Staphylococcus aureus* (Gp I) ou *Streptococcus pneumoniae* (Gp II). A monitorização das curvas de pressão através da oscilometria digital confirmou que a inoculação foi realizada no espaço pleural. Animais foram sacrificados (2º ou 3º dia) com propósito de avaliar a presença de líquido livre ou pus no espaço pleural, identificação bacteriológica do agente, dosagem de FNT- α no líquido pleural e no sangue, e descrição dos achados anatomo-patológicos.

Resultados: No Gp I 94,2% dos animais inoculados desenvolveram empiema e no Gp II 86,6%. Foi possível detectar concentrações de FNT- α superiores a 150 pg/ml no líquido pleural em 11 ratos (68,7%) no Gp I e em 19 ratos (73%) no Gp II. No Gp I, os níveis de FNT- α no líquido pleural foram de 150 a 13926,86 pg/ml (mediana: 5730,86; IQ₂₅₋₇₅: 150-6227,5), e no sangue foram de 150 a 12374,7 pg/ml (mediana:3022,1; IQ₂₅₋₇₅:150-6227,58); no Gp II os níveis foram respectivamente de 150 a 23603,47 pg/ml (mediana: 4923,65; IQ₂₅₋₇₅: 150-6995,25) e 150 a 7922,6 pg/ml (mediana: 208,4; IQ₂₅₋₇₅ 150-1405). Quando os grupos foram comparados, não houve diferença nas concentrações de FNT- α no sangue e na pleura dos animais inoculados; entretanto, no Gp II os níveis de FNT- α foram significativamente maiores no líquido pleural do que no sangue (p=0,035).

Conclusões: É possível induzir empiema em ratos através da inoculação intrapleural de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*. Ambas as bactérias levaram a aumento na concentração do FNT- α no líquido pleural e sangue; entretanto, o *Streptococcus pneumoniae* mostrou diferença significativa entre as concentrações de FNT- α no líquido pleural e sangue, mostrando uma resposta inflamatória mais localizada.

Key words: *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus pneumoniae*; rats, empyema thoracis, cytokines.

Introdução

O manejo terapêutico das efusões pleurais parapneumônicas permanece controverso na população pediátrica. As indicações de toracotomia, uso de fibrinolítico intrapleural e realização de videotoracoscopia não encontram consenso na literatura^{1, 2}. Dificuldades em delinear estudos populacionais prospectivos e controlados para avaliação de tais estratégias terapêuticas estimulam o desenvolvimento de modelos experimentais.

Vários estudos experimentais para indução de doença pleural têm sido descritos na literatura. Inicialmente conduzidos em porcos da Índia ou coelhos, necessitavam de equipamentos sofisticados para realização de toracotomia e suporte ventilatório dos animais, o que acarretava grande mortalidade dos mesmos^{3, 4, 5}. Mais recentemente foram descritos modelos de empiema induzidos por toracocentese, em coelhos e ratos, utilizando diferentes inóculos e com menor morbidade e mortalidade associados^{6, 7, 8}.

Por ocorrência da invasão bacteriana no espaço pleural observa-se fragmentação da parede celular destes germes. Os monócitos, macrófagos e outras células são estimuladas a liberarem mediadores inflamatórios (citoquinas) responsáveis pela resposta do hospedeiro a estes microorganismos. O FNT- α é uma das principais citoquinas liberadas nesta reação inflamatória. Sua principal ação é local, mas pode também agir à distância^{9, 10}. Concentrações aumentadas do FNT- α no líquido pleural já foram descritas em patologias que causam derrame pleural^{11, 12}. Odeh e colaboradores avaliaram o papel do FNT- α em efusões pleurais parapneumônicas não complicadas e empiema em crianças, e observaram uma nítida associação entre elevações na concentração de FNT- α pleural e a presença de polimorfonucleares na efusão pleural¹³. Sendo assim, a análise do comportamento das concentrações desta citoquina em modelos experimentais, facilmente reproduzíveis, poderia ser de grande relevância.

O presente estudo tem por objetivo determinar as concentrações (sérica e pleural) de FNT- α em modelo experimental de empiema induzido por inoculação intrapleural de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, e avaliar se há diferença na concentração de FNT- α de acordo com o tipo de bactéria inoculada.

Métodos

Estudo experimental controlado realizado no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa da Instituição e os animais tratados de acordo com o protocolo de cuidados com animais de laboratório, vigentes na resolução normativa 04/97.

Foram selecionados ratos Wistar, pesando entre 300-400g, obtidos aleatoriamente do mesmo criador. Os ratos foram submetidos à inoculação intrapleural, por toracocentese, de 0,3 ml de 10^{10} unidades formadoras de colônias de *Streptococcus pneumoniae* ou *Staphylococcus aureus*, cultivadas em caldo Cérebro-coração (BHI).

Os grupos foram constituídos de maneira seqüencial e divididos de acordo com a bactéria inoculada. O procedimento iniciou com a inoculação de *Staphylococcus aureus* (Gp I), em função de experiência prévia dos pesquisadores com o modelo experimental utilizado⁷. O grupo foi constituído por 17 animais. No grupo constituído pela inoculação de *Streptococcus pneumoniae* (Gp II), foi optado por conduzir o experimento em blocos de cinco animais, visto que não possuíamos experiência prévia com a utilização deste inóculo. Foi programado um número de 30 animais com o objetivo de validar o experimento.

Para realização da toracocentese os ratos foram anestesiados com xilasina 10mg/kg e quetamina 90mg/kg. Todos os animais foram posicionados em decúbito dorsal e puncionados no 4º espaço intercostal direito com abocath número 24. A confirmação do sítio anatômico era obtida por medida de pressão intrapleural utilizando-se um oscilômetro de pressão digital desenvolvido pela Engenharia Biomédica do HCPA, já utilizado previamente para esta finalidade⁷.

A eutanásia dos animais foi realizada em câmara de CO₂, 72 horas após a inoculação no Gp I, e 48 horas após a inoculação no Gp II. Após tal procedimento, eram

avaliados a presença de líquido livre ou pus no espaço pleural sob visualização direta, identificação bacteriológica do agente (líquido pleural e sangue), dosagem de FNT- α (líquido pleural e sangue) e descrição dos achados anatomopatológicos encontrados. Foi considerado empiema o líquido pleural com identificação de bactéria.

O exame bacteriológico (líquido pleural e sangue) foi processado de acordo com rotinas do laboratório de microbiologia do HCPA. A dosagem do FNT- α foi feita por método de ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assays*), de acordo com as instruções do fabricante, com kit *OptEIA™ Human TNF- α Set* (Laboratório Pharmingen – EUA). O nível mínimo de detecção estabelecido pelo fabricante do kit foi de 150 picogramas (pg) por mililitro.

Quanto aos achados anatomopatológicos, foi realizada biópsia pleural e pulmonar e o material encaminhado para análise histopatológica. As peças foram conservadas em formaldeído para posterior fixação em parafina. Após seccionadas, foram coradas em hematoxilina/eosina e analisadas em microscópio óptico para avaliar a presença de infiltrado inflamatório, fibrina, abscesso ou necrose. Além disso, foi realizada análise macroscópica (Tabela 1) para determinar a severidade da reação pleural².

Os dados foram armazenados no programa Microsoft Excel 2000, e analisados através do pacote estatístico SPSS versão 12. As variáveis quantitativas simétricas foram expressas através de média e desvio-padrão, e as variáveis assimétricas através da mediana e amplitude interquartil (P₂₅ a P₇₅). Os dados categóricos foram expressos por frequências e percentagens. A análise inferencial foi realizada através do teste qui-quadrado, teste exato de Fisher e teste de McNemar. A significância dos testes estatísticos foi estabelecida em 95% ($p \leq 0,05$).

Resultados

Dos 17 animais do Gp I, apenas um (5,8%) não desenvolveu empiema. A quantidade de líquido variou de 0.1 - 3.5 ml (média=1.9 \pm 0.6ml). Neste grupo foi possível detectar concentrações de FNT- α superiores a 150 pg/ml em 11 ratos (68,7%). Os níveis de FNT- α no líquido pleural foram de 150 a 13926,86 pg/ml (mediana:

5730,86; IQ₂₅₋₇₅: 150-6227,5). No sangue, as concentrações de FNT- α superiores a 150 pg/ml foram detectadas em nove ratos (52,9%). Os níveis de FNT- α no sangue foram de 150 a 12374,7 pg/ml (mediana: 3022,1; IQ₂₅₋₇₅: 150-6227,58). Tais níveis não demonstraram diferença significativa entre as concentrações pleurais e séricas de FNT- α ($p=0,727$).

Dos 30 animais do Gp II, quatro (13,3%) não desenvolveram empiema. A quantidade de líquido variou de 0.1 - 3.8 ml (média=1.8 \pm 1.3ml). Foi possível detectar concentração de FNT- α superiores a 150 pg/ml no líquido pleural em 19 ratos (73%). Os níveis de FNT- α oscilaram de 150 a 23603,47 pg/ml (mediana: 4923,65; IQ₂₅₋₇₅: 150-6995,25). No sangue, as concentrações de FNT- α superiores a 150 pg/ml foram detectadas em 10 ratos (33,3%). Os níveis de FNT- α no sangue variaram de 150 a 7922,6 pg/ml (mediana: 208,4; IQ₂₅₋₇₅: 150-1405). Neste grupo, observamos diferenças significativas nos níveis de concentração de FNT- α encontrados na pleura e no sangue ($p=0,035$).

A identificação da bactéria inoculada no líquido pleural ocorreu em 12 dos 16 ratos do Gp I (75%) e 22 dos 26 ratos com líquido pleural do Gp II (84,6%). No sangue, foi identificada a bactéria inoculada em 16 dos 17 ratos inoculados no Gp I (94,1%) e em 26 dos 30 ratos do Gp II (86,6%).

Comparando o volume de líquido obtido entre os dois grupos não detectamos diferença significativa ($p= 0.94$), o mesmo sendo observado quanto às concentrações obtidas de FNT- α no líquido pleural ($p= 0.92$).

Quando comparados os níveis de FNT- α no sangue observamos uma diferença significativa ($p=0,03$) com níveis bem mais elevados no grupo do *Staphylococcus aureus* (Gp I).

A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) das concentrações de TNF- α (líquido pleural e no sangue) para discriminação de empiema estão apresentados na tabela 2.

Quanto aos achados da análise anatomopatológica no Gp I, dos 17 ratos inoculados apenas um não demonstrava reação inflamatória pleural na análise microscópica. A intensidade da reação pleural inflamatória foi leve em 88% dos casos (Tabela 3). Dos 26 animais do Gp II em que foi possível obter líquido pleural apenas um

não demonstrava alterações inflamatórias pleurais na análise microscópica. A intensidade do processo inflamatório variou de moderada a acentuada em 44,4% dos casos (Tabela 3). Quando a intensidade do processo inflamatório entre os dois grupos foi comparada através do teste exato de Fisher, observamos uma maior intensidade do processo inflamatório no grupo do *Streptococcus pneumoniae* ($p=0,012$).

Todos os animais que desenvolveram empiema foram eutanasiados em fase fibrinopurulenta da doença, visto que não foi detectada fibrose em nenhum caso. As alterações microscópicas compatíveis com processo inflamatório ficaram restritas ao espaço pleural.

Discussão

O presente estudo demonstrou ser possível o desenvolvimento experimental de empiema por toracocentese em ratos utilizando diferentes inóculos. Da mesma forma, evidenciou que tanto *Staphylococcus aureus*, quanto *Streptococcus pneumoniae*, desencadeiam uma resposta inflamatória local acompanhada por elevação das concentrações pleurais de FNT- α . Entretanto, não foi observado diferenças nas concentrações pleurais desta citocina quando os dois patógenos foram comparados.

Comparando os níveis de FNT- α mensurados entre o sangue e o líquido pleural, observamos uma significativa elevação de suas concentrações no líquido pleural, mediada basicamente pelos animais do grupo do *Streptococcus pneumoniae* ($p=0,03$). Porter e colaboradores¹⁰ já haviam referido a possibilidade de diferença nas concentrações de citocinas observadas entre líquido pleural e sangue. Uma elevação mais marcada no líquido pleural vem a sugerir uma resposta inflamatória compartimentada, com elevação e produção local da citocina mais significativa no espaço pleural.

Durante os anos 80, as citocinas foram descritas como importantes mediadores multifuncionais no comportamento celular e na comunicação entre as células¹⁴. As citocinas influenciam o comportamento celular ligando-se especificamente a receptores na superfície da membrana da célula alvo^{9, 10}. Como os hormônios endócrinos, as citocinas podem agir à distância, mas sua principal ação é local^{9,10}.

Analisando individualmente as concentrações de FNT- α em ambos os fluidos (sangue e líquido pleural) observamos um mesmo comportamento para as suas concentrações apenas no líquido pleural. Tanto o grupo *Staphylococcus aureus* quanto o *Streptococcus pneumoniae* apresentaram elevação nas concentrações de FNT- α , sem apresentar diferença entre os grupos. Entretanto, as concentrações de FNT- α no sangue foram mais elevadas no grupo do *Staphylococcus aureus*, como já referimos anteriormente. Tal achado parece ser comparável com a evolução clínica dos processos infecciosos pulmonares em humanos, onde a etiologia estafilocócica costuma apresentar doença associada a maiores manifestações sistêmicas¹⁵.

Na descrição dos achados anatomopatológicos também podemos observar um comportamento similar. A intensidade do processo inflamatório pleural foi caracterizada como leve em 88% dos animais do Gp I, enquanto no Gp II, tal caracterização foi de 56%. Além disto, nenhum animal no Gp I apresentou processo inflamatório pleural acentuado, enquanto no Gp II a inflamação acentuada na pleura ocorreu em 27% dos ratos.

A detecção de níveis de FNT- α acima de 150 pg/ml no líquido pleural numa tentativa de discriminar os casos de empiema (caracterizado pela identificação da bactéria ou pus) em ambos os grupos apresentou uma sensibilidade de 71,4%, uma especificidade de 100%, um valor preditivo positivo (VPP) de 100% e um valor preditivo negativo (VPN) de 29,4%. Tal achado pode vir a ter significância na prática clínica, caso a identificação bacteriana seja um critério utilizado para indicação ou realização de determinado procedimento terapêutico. Uma concentração de FNT- α abaixo dos níveis de detecção do kit (150 pg/ml) no líquido pleural dificilmente estaria associada à presença de bactéria no mesmo.

A presença de bactéria no fluido pleural poderia desencadear complexas respostas de defesa, incluindo a ativação da cascata do complemento, migração de neutrófilos para o espaço pleural e consequente aumento na produção de citocinas¹⁶.

Uma questão metodológica importante a ser discutida faz referência a diferença nos tempos estabelecidos para a eutanásia dos animais. Uma diferença de 24 horas poderia dificultar a comparação no comportamento da resposta inflamatória. Tal rotina em nosso experimento foi determinada por estudo piloto conduzido em cinco animais,

onde o tempo previamente estabelecido para eutanásia de 72 horas, mostrou-se inviável no grupo do *Streptococcus pneumoniae*. Todos os animais morreram entre 48 e 72 horas pós-toracocentese, inviabilizando a possibilidade de comparação com o grupo do *Staphylococcus aureus*.

Sendo assim, nosso estudo demonstrou ser possível induzir empiema por toracocentese com ambas as bactérias utilizadas. Foi possível ainda identificar a produção pleural de FNT- α como resposta inflamatória à presença de tais bactérias no líquido pleural, sem diferença significativa entre elas. Por outro lado, foi visto que, quando avaliada a resposta inflamatória sistêmica, o grupo do *Staphylococcus aureus* apresentou concentrações séricas de FNT- α significativamente mais elevadas. Tais achados abrem perspectivas para novos estudos do comportamento desta citocina e o tratamento de empiemas através da utilização deste modelo experimental de fácil execução e reprodutibilidade.

Bibliografia

1. Doski JJ, Lou D, Hicks BA, Megison SM, Sanchez P, Contidor M, et al. Management of parapneumonic collections in infants and children. *J Pediatr Surg.* 2000 Feb;35(2):265-8; discussion 9-70.
2. Thompson W. Pleural effusion and empyema. In: DL Levin FM, editor. *Pediatric Intensive Care.* 2 ed; 1997. p. 387-90.
3. Mavroudis C, Ganzel BL, Cox SK, Polk HC, Jr. Experimental aerobic-anaerobic thoracic empyema in the guinea pig. *Ann Thorac Surg.* 1987 Mar;43(3):298-302.
4. Mavroudis C, Ganzel BL, Katzmark S, Polk HC, Jr. Effect of hemothorax on experimental empyema thoracis in the guinea pig. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1985 Jan;89(1):42-9.
5. Sahn SA, Taryle DA, Good JT, Jr. Experimental empyema. Time course and pathogenesis of pleural fluid acidosis and low pleural fluid glucose. *Am Rev Respir Dis.* 1979 Aug;120(2):355-61.
6. Fraga J, Amantéa S, Argenta R, Moura L, Nuch C, Borowski S. Indução de empiema em ratos através da inoculação pleural de bactérias. *J Pediatr.* 2001;77:469-74.
7. Schopf LF, Fraga JC, Amantea SL, Sanches P, Muller A, Borowski S, et al. Induction of pleural empyema in rats by thoracentesis with intrapleural pressure monitoring. *Pediatr Surg Int.* 2004 Jul;20(7):515-9.
8. Strahilevitz J, Lev A, Levi I, Fridman E, Rubinstein E. Experimental pneumococcal pleural empyema model: the effect of moxifloxacin. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Mar;51(3):665-9.
9. Marie C, Losser MR, Fitting C, Kermarrec N, Payen D, Cavaillon JM. Cytokines and soluble cytokine receptors in pleural effusions from septic and nonseptic patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1997 Nov;156(5):1515-22.
10. Porter JM. Cytokines and pleural drainage fluid: do local levels make a difference? *Chest.* 1999 Jun;115(6):1489-90.
11. Akarsu S, Kurt AN, Dogan Y, Yilmaz E, Godekmerdan A, Aygun AD. The differential diagnostic values of cytokine levels in pleural effusions. *Mediators Inflamm.* 2005 Feb 24;2005(1):2-8.
12. Alexandrakis MG, Coulocheri SA, Bouros D, Mandalaki K, Karkavitsas N, Eliopoulos GD. Evaluation of inflammatory cytokines in malignant and benign pleural effusions. *Oncol Rep.* 2000 Nov-Dec;7(6):1327-32.
13. Odeh M, Sabo E, Srugo I, Oliven A. Tumour necrosis factor alpha in the diagnostic assessment of pleural effusion. *Qjm.* 2000 Dec;93(12):819-24.
14. Kelley J. Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis.* 1990 Mar;141(3):765-88.
15. Gonzalez BE, Hulten KG, Dishop MK, Lamberth LB, Hammerman WA, Mason EO, Jr., et al. Pulmonary manifestations in children with invasive community-acquired *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis.* 2005 Sep 1;41(5):583-90.
16. Antony VB. Immunological mechanisms in pleural disease. *Eur Respir J.* 2003 Mar;21(3):539-44.

Tabela 1. Escala de reação pleural macroscópica

Classe	Achado macroscópico
0	ausência de líquido pleural
1	líquido pleural turvo ou sanguinolento
2	pus livre na cavidade
3	pus e septações
4	fibrose

*adaptado de Mavroudis (4)

Tabela 2 Sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) das concentrações de TNF- α (líquido pleural e no sangue) na discriminação de empiema.

Concentração de FNT- α \geq	Sangue	Líquido pleural
150 pg /ml		
Sensibilidade	40.5%	71.4%
Especificidade	60%	100%
Valor preditivo positivo	89.5%	100%
Valor preditivo negativo	10.7%	29.4%

Tabela 3 Classificação da reação inflamatória pleural.

Reação	Grupo I	Grupo 2
pleural inflamatória	(<i>Staphylococcus aureus</i>) n=17	(<i>Streptococcus pneumoniae</i>) n=26
Ausente	1	1
Leve	15	14
Moderada	1	4
Acentuada	0	7

6. Artigo Original em Inglês

Tumor necrosis factor alpha in experimental empyema thoracis

Vanessa Feller Martha,¹ José Carlos Fraga,² Sérgio Luis Amantéa,³ Paulo Sanches,⁴ Jane Kulczynski,⁵ Denise P Machado,⁶ Fernanda Canani⁷

1. Hospital Santo Antônio and Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS, Brazil.
2. School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.
3. Department of Pediatrics, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA) and Hospital Santo Antônio, Porto Alegre, RS, Brazil.
4. Department of Biomedical Engineering, HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil.
5. Department of Pathology, UFRGS and HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil.
6. Unit of Microbiology and Molecular Biology, Division of Clinical Pathology, HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil.
7. School of Medicine, UFRGS and HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil.

This study was carried out at the Division of Pediatric Thoracic Surgery /Division of Pediatric Surgery and Center for Experimental Research of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil.

This study was financially supported by FIPE (Research Incentive Fund) of HCPA.

ABSTRACT

Purpose: This study aimed to determine the serum and pleural concentration of TNF- α and to verify whether there is some difference in empyemas induced intrapleural inoculation of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*, these bacteria.

Methods: Wistar rats were inoculated with *Staphylococcus aureus* (Group I) or *Streptococcus pneumoniae* (Group II). Animals were checked for the presence of free fluid or pus in the pleural space was checked; the bacteriological agent was identified; TNF- α concentration in the pleural fluid and in blood was determined; pathoanatomical examination was performed.

Results: In Group I, 94.2% of the animals developed empyema, comparatively to 86.3% in Group II. TNF- α levels in Group I ranged between 150 and 13926.86 pg/ml in the pleural fluid and between 150 and 12374.7 pg/ml in blood; in Group II, these levels varied between 150 and 23603.47 pg/ml and between 150 and 7922.6 pg/ml, respectively. TNF- α levels were significantly higher in the pleural fluid than in the blood of Group II animals.

Conclusions: Empyema can be induced in rats by intrapleural inoculation of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*. Both bacteria increased the TNF- α concentration in the pleural fluid and in the blood; *Streptococcus pneumoniae* showed significant difference between TNF- α concentrations in the pleural fluid and in the blood.

Key words: *Staphylococcus aureus*; *Streptococcus pneumoniae*; rats, empyema thoracis, cytokines.

INTRODUCTION

The therapeutic management of parapneumonic pleural effusions is still controversial in the pediatric population. No consensus exists in the literature on the indication of thoracotomy, administration of intrapleural fibrinolytics and video-assisted thoracoscopic surgery^{1,2}. Difficulty in conducting prospective and controlled population-based studies for the assessment of these therapeutic strategies has encouraged the development of experimental models.

Several experimental studies on the induction of pleural disease have been described in the literature. Such studies used to be conducted in guinea pigs or rabbits, required sophisticated equipment for thoracotomy and ventilatory support of animals, and led to a high rate of mortality^{3, 4, 5}. Quite recently, models of empyema induced by thoracentesis in rabbits and rats, using different inocula, have caused lower morbidity and mortality^{6, 7, 8}.

As a result of bacterial invasion of the pleural space, the cell wall of these agents becomes fragmented. Monocytes, macrophages and other cells are prompted to release inflammatory mediators (cytokines) that trigger the host's response to these microorganisms. TNF- α is one of the major cytokines released by this inflammatory reaction. It acts locally, but it can also act remotely^{9, 10}. Elevated TNF- α concentrations in the pleural fluid have already been described in diseases that cause pleural effusion^{11, 12}. Odeh¹³ assessed the role of TNF- α in uncomplicated parapneumonic pleural effusions and empyema in children and found a clear association between elevated TNF- α concentrations and the presence of polymorphonuclears in pleural effusion. Therefore,

determining the concentrations of this cytokine in experimental models, which are easily reproducible, may be of great value.

The aim of the present study was to determine the serum and pleural concentrations of TNF- α in an experimental model of empyema induced by the intrapleural inoculation of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae*, and to assess whether TNF- α concentration varies according to the type of bacterial strain inoculated.

METHODS

A controlled experimental study was carried out at the Center for Experimental Research of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil. The study protocol was approved by the Research Ethics Committee of HCPA and the animals were handled in compliance with the Principles of Laboratory Animal Care.

Wistar rats, weighing 300-400g, were randomly selected from the same breeder. The rats were submitted to intrapleural instillation, through thoracentesis, of 0.3 ml of 10^{10} colony-forming units of *Streptococcus pneumoniae* or *Staphylococcus aureus*, grown in brain-heart infusion (BHI) broth.

The groups were sequentially selected and stratified according to the inoculated strain. The procedure began with the inoculation of *Staphylococcus aureus* (Group I), due to the researchers' previous experience with the experimental model used⁷. Group I consisted of 17 animals. In Group II, where animals were inoculated with *Streptococcus pneumoniae*, the experiment was conducted in blocks of five animals, since we had no

previous experience with the use of this type of inoculum. The sample included 30 animals, as this size statistically validates the experiment.

Before thoracentesis, all animals were anesthetized with xylazine (10mg/kg) and ketamine (90mg/kg). All animals were placed in dorsal recumbency and thoracotomy through the right fourth intercostal space was performed using Abocath #24. Confirmation of the anatomical site was obtained by intrapleural pressure measurement using a digital oscilloscope developed by the Biomedical Engineering Department of HCPA, which had already been previously used for the same purpose⁷.

The animals were euthanized in a CO₂ chamber 72 hours after inoculation in Group I and 48 hours after inoculation in Group II. Thereafter, the animals were assessed as to the presence of free fluid or pus in the pleural space under direct visualization; the bacteriological agent was identified (in pleural fluid and in blood); TNF- α concentration was determined (in pleural fluid and in blood); and a pathoanatomical examination was performed.

The bacteriological examination (of pleural fluid and blood) was performed according to the routines of the Laboratory of Microbiology of HCPA. TNF- α concentration was determined by ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), using the OptEIATM Human TNF- α Set kit (Pharmingen Laboratory, USA), following the manufacturer's recommendations. The minimum detection level established by the kit manufacturer corresponded to 150 picograms (pg) per milliliter.

Pleural and lung biopsies were performed and the collected specimens were submitted to histopathological analysis. The specimens were stored in formaldehyde and processed for later paraffin block embedding. After being sectioned, the specimens were

stained with hematoxylin-eosin and analyzed under a light microscope to check for the presence of inflammatory infiltrate, fibrin, abscess, or necrosis. In addition, a macroscopic analysis (Table 1) was undertaken to determine the severity of pleural reaction².

The data were compiled into a Microsoft Excel 2000 spreadsheet and analyzed by SPSS version 12. The symmetric quantitative variables were expressed as mean and standard deviation, and the asymmetric variables were denoted as median and interquartile range (IQR 25-75). The categorical variables were expressed as frequencies and percentage values. The inferential analysis was made using the chi-square test, Fisher's exact test and McNemar's test. Statistical significance was established at 95% ($p \leq 0.05$).

RESULTS

Out of 17 animals in Group I, only one (5.8%) did not develop empyema. The amount of pleural fluid ranged from 0.1 to 3.5 ml (mean= 1.9 ± 0.6 ml). In this group, TNF- α concentrations were greater than 150 pg/ml in 11 rats (68.7%). TNF- α levels in the pleural fluid ranged between 150 and 13926.86 pg/ml (median: 5730.86; IQR25-75: 150-6227.5). In blood, TNF- α concentrations were greater than 150 pg/ml in nine rats (52.9%). Serum TNF- α levels ranged between 150 and 12374.7 pg/ml (median: 3022.1; IQR25-75: 150-6227.58). These levels did not reveal significant differences between pleural and serum TNF- α concentrations ($p=0.727$).

Of 30 animals in Group II, four (13.3%) did not develop empyema. The amount of fluid ranged from 0.1 to 3.8 ml (mean= 1.8 ± 1.3 ml). TNF- α concentrations greater

than 150 pg/ml were found in the pleural fluid of 19 rats (73%). TNF- α levels ranged between 150 and 23603.47 pg/ml (median: 4923.65; IQR25-75: 150-6995.25). Serum TNF- α concentrations greater than 150 pg/ml were detected in 10 rats (33.3%). TNF- α serum levels ranged from 150 to 7922.6 pg/ml (median: 208.4; IQR25-75: 150-1405). In this group, there were significant differences in TNF- α levels detected in the pleural fluid and in blood ($p=0.035$).

The bacterial strain inoculated into the pleural space was identified in 12 of 16 rats in Group I (75%) and in 22 of 26 rats in Group II (84.6%). In blood, the bacterial strain was identified in 16 of 17 inoculated rats in Group I (94.1%) and in 26 of 30 rats in Group II (86.6%).

No significant difference was found in the amount of fluid detected in both groups ($p=0.94$); the same occurred with the amount of TNF- α found in the pleural fluid ($p=0.92$).

As to the serum levels of TNF- α , there was a significant difference ($p=0.03$) in Group I, which showed higher concentrations of this cytokine.

The sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of TNF- α levels (in pleural fluid and in blood) for discrimination of empyema are shown in Table 2.

The pathoanatomical findings in Group I revealed that only one out of 17 inoculated rats did not have a pleural inflammatory reaction in the microscopic analysis. Mild pleural inflammatory reaction was observed in 88% of cases (Table 3). Of 26 animals in Group II, only one did not have pleural inflammatory reactions in the microscopic analysis. Moderate to severe inflammatory reaction was found in 44.4% of

cases (Table 3). When the groups were compared in terms of the intensity of the inflammatory process using Fisher's exact test, the group inoculated with *Streptococcus pneumoniae* showed a more intense inflammatory process ($p=0.012$).

All of the animals which developed empyema were euthanized during the fibrinopurulent stage of the disease, since no case of fibrosis was detected. Microscopic findings compatible with inflammatory reaction were restricted to the pleural space.

DISCUSSION

The present study demonstrated that it is possible to experimentally induce empyema by thoracentesis in rats using different inocula. Likewise, it was shown that both *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* trigger a local inflammatory response accompanied by elevated TNF- α concentration in the pleural fluid. However, no differences in the pleural concentration of TNF- α were detected when both pathogens were compared.

By comparing TNF- α levels in blood and in the pleural fluid, we perceived a significant increase in TNF- α concentration in the pleural fluid, basically mediated by animals inoculated with *Streptococcus pneumoniae* ($p=0.03$). Porter et al. (9) had already detected possible differences in cytokine levels in the pleural fluid and in blood. A remarkably higher cytokine level in the pleural fluid suggests a compartmental inflammatory response, with elevation and local production of the most significant cytokine in the pleural space.

In the 1980s, cytokines were described as important multifunctional markers of cellular behavior and of communication between cells¹⁴. Cytokines influence cellular

behavior by specifically binding to receptors on the surface of the target cell membrane⁹,¹⁰. Just like endocrine hormones, cytokines may act remotely, but their major action occurs at the local level^{9,10}.

The separate analysis of TNF- α concentration in blood and in the pleural fluid revealed the same behavior for TNF- α levels only in the pleural fluid. Animals inoculated with *Staphylococcus aureus* and those inoculated with *Streptococcus pneumoniae* had high TNF- α levels, without any difference between groups. Nevertheless, TNF- α concentration in the blood was higher in animals inoculated with *Staphylococcus aureus*, as previously mentioned. This finding may be compared to the clinical outcome of infectious processes in human lungs, where staphylococcal etiology often shows disease associated with more severe systemic disorders¹⁵.

The pathoanatomical findings also showed a similar behavior. The pleural inflammatory process was regarded as mild in 88% of animals in Group I and in 56% of animals in Group II. Also, no animal in Group I had severe pleural inflammatory reaction, but 27% of the rats from Group II presented with a severe pleural reaction.

Detection of TNF- α levels greater than 150 pg/ml in the pleural fluid in an attempt to identify cases of empyema (characterized by the presence of bacteria or pus) in both groups had a sensitivity of 71.4%, specificity of 100%, a positive predictive value (PPV) of 100% and a negative predictive value (NPV) of 29.4%. This finding may be significant in clinical practice when bacterial identification is a criterion for indicating or conducting a given therapeutic procedure. A TNF- α concentration in the pleural fluid below the detection levels recommended by the kit (150 pg/ml) is unlikely to be associated with the presence of bacteria.

The presence of bacteria in the pleural fluid may trigger complex defense responses, including the activation of complement cascade, neutrophil migration to the pleural space and consequent increase in cytokine production¹⁶.

An important methodological issue concerns the difference in the times established for euthanasia. A 24-hour difference may hinder the comparison of inflammatory response behaviors. This routine in our experiment was determined by a pilot study performed in five animals, where the time previously set for euthanasia (72 hours) proved unfeasible for the animals inoculated with *Streptococcus pneumoniae*. All animals died within 48 to 72 hours after thoracentesis, thus not allowing us to establish a comparison with those animals inoculated with *Staphylococcus aureus*.

Therefore, our study showed that it is possible to induce empyema by thoracentesis using both inocula. It was possible to determine the pleural production of TNF- α as inflammatory response to the presence of bacteria in the pleural fluid, without any significant difference between them. On the other hand, when the systemic inflammatory response was evaluated, the animals inoculated with *Staphylococcus aureus* had a significantly higher TNF- α serum concentration. These findings pave the way for further studies on the behavior of this cytokine and on the treatment of empyema by means of this experimental model, which can be easily implemented and reproducible.

REFERENCES

1. Doski JJ, Lou D, Hicks BA, Megison SM, Sanchez P, Contidor M, et al. Management of parapneumonic collections in infants and children. *J Pediatr Surg*. 2000 Feb;35(2):265-8; discussion 9-70.
2. Thompson W. Pleural effusion and empyema. In: DL Levin FM, editor. *Pediatric Intensive Care*. 2 ed; 1997. p. 387-90.
3. Mavroudis C, Ganzel BL, Cox SK, Polk HC, Jr. Experimental aerobic-anaerobic thoracic empyema in the guinea pig. *Ann Thorac Surg*. 1987 Mar;43(3):298-302.
4. Mavroudis C, Ganzel BL, Katzmark S, Polk HC, Jr. Effect of hemothorax on experimental empyema thoracis in the guinea pig. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1985 Jan;89(1):42-9.
5. Sahn SA, Taryle DA, Good JT, Jr. Experimental empyema. Time course and pathogenesis of pleural fluid acidosis and low pleural fluid glucose. *Am Rev Respir Dis*. 1979 Aug;120(2):355-61.
6. Fraga J, Amantéa S, Argenta R, Moura L, Nuch C, Borowski S. Indução de empiema em ratos através da inoculação pleural de bactérias. *J Pediatr*. 2001;77:469-74.
7. Schopf LF, Fraga JC, Amantea SL, Sanches P, Muller A, Borowski S, et al. Induction of pleural empyema in rats by thoracentesis with intrapleural pressure monitoring. *Pediatr Surg Int*. 2004 Jul;20(7):515-9.
8. Strahilevitz J, Lev A, Levi I, Fridman E, Rubinstein E. Experimental pneumococcal pleural empyema model: the effect of moxifloxacin. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Mar;51(3):665-9.
9. Marie C, Losser MR, Fitting C, Kermarrec N, Payen D, Cavaillon JM. Cytokines and soluble cytokine receptors in pleural effusions from septic and nonseptic patients. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Nov;156(5):1515-22.
10. Porter JM. Cytokines and pleural drainage fluid: do local levels make a difference? *Chest*. 1999 Jun;115(6):1489-90.
11. Akarsu S, Kurt AN, Dogan Y, Yilmaz E, Godekmerdan A, Aygun AD. The differential diagnostic values of cytokine levels in pleural effusions. *Mediators Inflamm*. 2005 Feb 24;2005(1):2-8.
12. Alexandrakis MG, Coulocheri SA, Bouros D, Mandalaki K, Karkavitsas N, Eliopoulos GD. Evaluation of inflammatory cytokines in malignant and benign pleural effusions. *Oncol Rep*. 2000 Nov-Dec;7(6):1327-32.
13. Odeh M, Sabo E, Srugo I, Oliven A. Tumour necrosis factor alpha in the diagnostic assessment of pleural effusion. *Qjm*. 2000 Dec;93(12):819-24.
14. Kelley J. Cytokines of the lung. *Am Rev Respir Dis*. 1990 Mar;141(3):765-88.
15. Gonzalez BE, Hultén KG, Dishop MK, Lamberth LB, Hammerman WA, Mason EO, Jr., et al. Pulmonary manifestations in children with invasive community-acquired *Staphylococcus aureus* infection. *Clin Infect Dis*. 2005 Sep 1;41(5):583-90.
16. Antony VB. Immunological mechanisms in pleural disease. *Eur Respir J*. 2003 Mar;21(3):539-44.

Table 1 Macroscopic scale of pleural reaction*

Class	Macroscopic finding
5	Absence of pleural fluid
6	Turbid or bloody pleural fluid
7	Collection of pus in the cavity
8	pus and septations
9	fibrosis

* adapted from Mavroudis et al. (4)

Table 2 Sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV) and negative predictive value (NPV) of TNF- α levels (in pleural fluid and in blood) for discrimination of empyema

TNF- α concentration \geq 150 pg /ml	Blood	Pleural fluid
Sensitivity	40.5%	71.4%
Specificity	60%	100%
Positive predictive value	89.5%	100%
Negative predictive value	10.7%	29.4%

Table 3 Classification of pleural inflammatory reaction		
Pleural	Group I	Group 2
inflammatory reaction	<i>(Staphylococcus aureus)</i> n=17	<i>(Streptococcus pneumoniae)</i> n=26
Absent	1	1
Mild	15	14
Moderate	1	4
Severe	0	7

7. Considerações Finais

Considerações Finais

Nosso estudo é pioneiro desenvolvimento de empiema por *Streptococcus pneumoniae* em ratos com a técnica de toracocentese guiada por oscilometria digital.

O comportamento das concentrações de FNT- α foi similar para *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus* no líquido pleural.

As concentrações de FNT- α no líquido pleural do grupo do *Streptococcus pneumoniae* foram mais elevadas em relação às concentrações séricas, sugerindo uma resposta inflamatória mais localizada.

Tais achados abrem perspectivas para novos estudos do comportamento desta citocina e o tratamento de empiemas através da utilização deste modelo experimental de fácil execução e reprodutibilidade.

8. Anexos



Figura 1 Toracocentese com abocath para inoculação da bactéria.

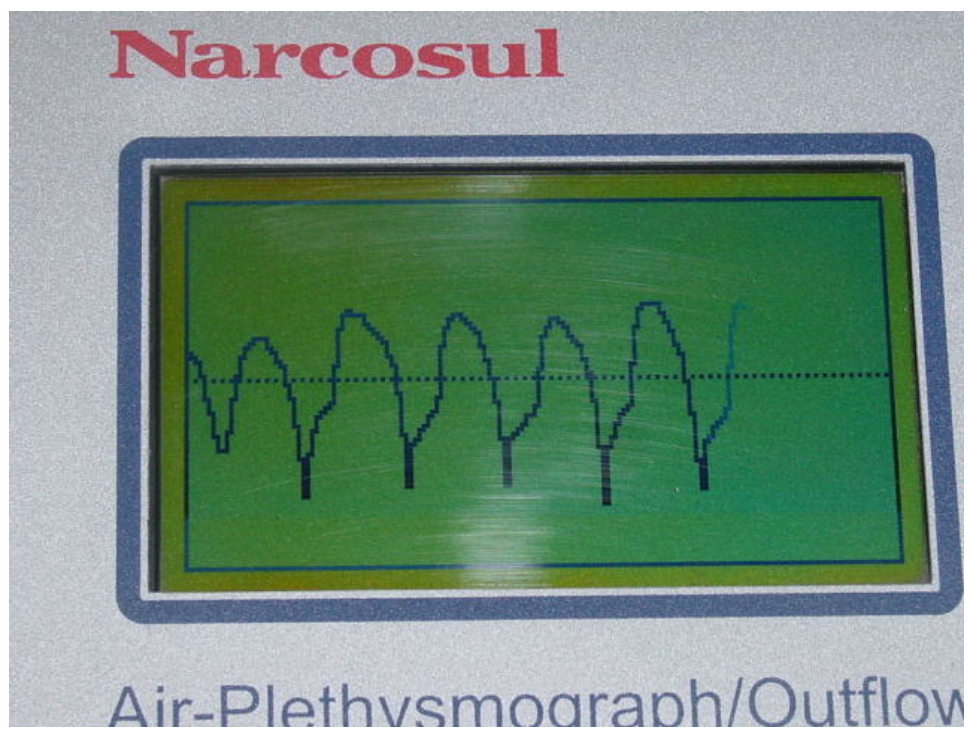


Figura 2 Onda de pressão no espaço pleural.



Figura 3 Monitor de pressão pleural.



Figura 4 Câmara de CO₂.

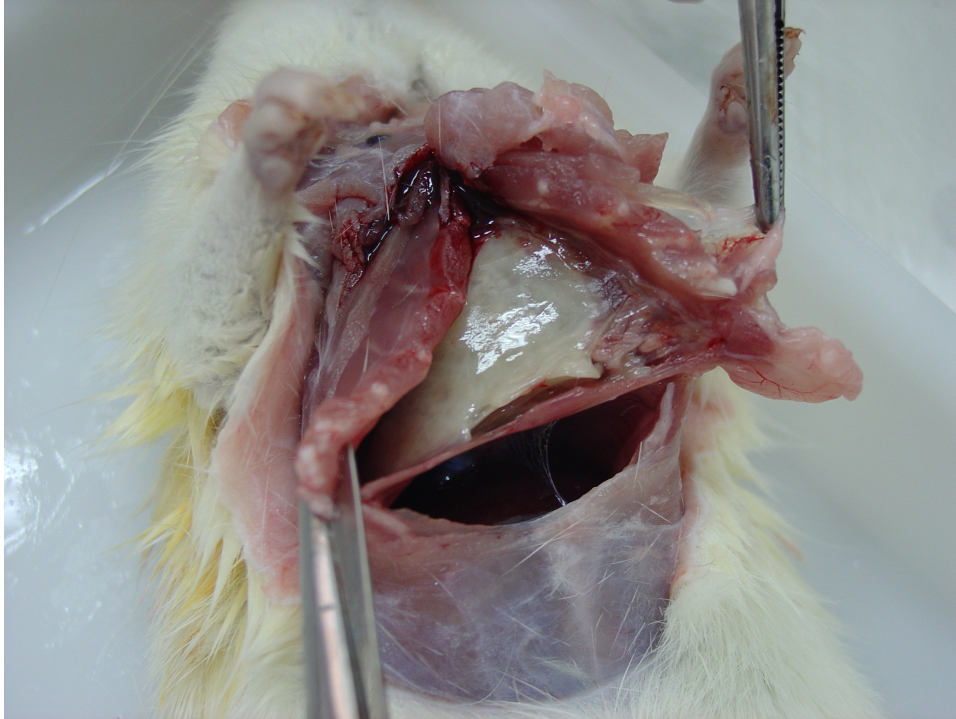


Figura 5 Necrópsia em rato do grupo do *Streptococcus pneumoniae*.

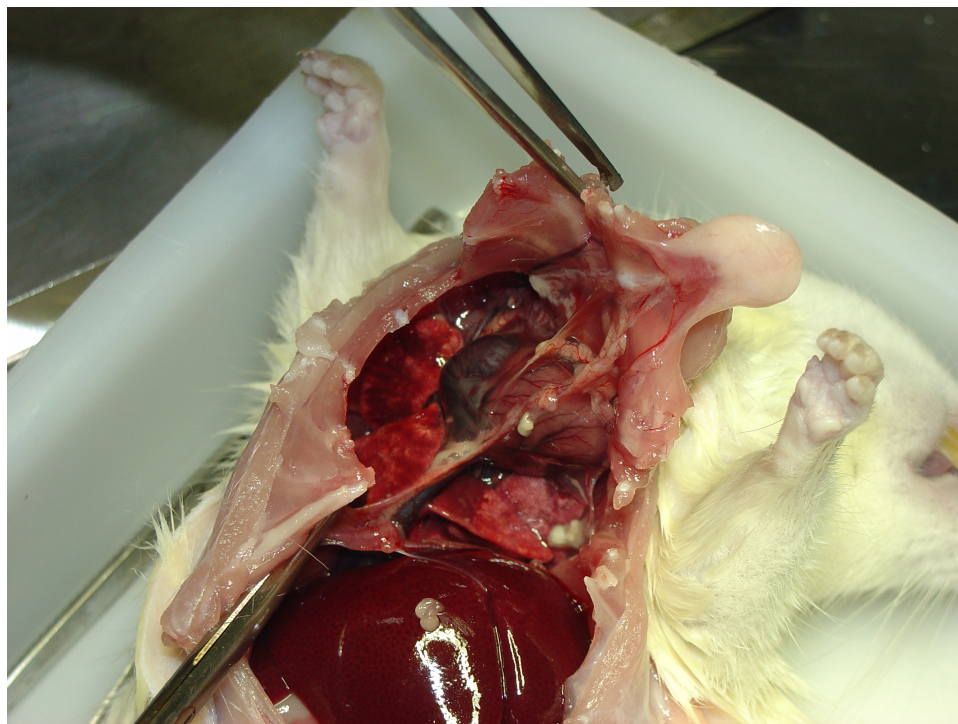


Figura 6 Necrópsia em rato do grupo do *Staphylococcus aureus*.