



ROGÉRIO FORTUNATO DE BARROS

**“AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO
PNEUMOPERITÔNIO CIRÚRGICO COM CO₂
SOBRE O PARÊNQUIMA RENAL DE RATOS JOVENS”**

***“ACUTE KIDNEY INJURY DURING SURGICAL CO₂
PNEUMOPERITONEUM IN YOUNG RATS”***

CAMPINAS

2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

ROGÉRIO FORTUNATO DE BARROS

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DO
PNEUMOPERITÔNIO CIRÚRGICO COM CO₂
SOBRE O PARÊNQUIMA RENAL DE RATOS JOVENS**

Orientador: **Prof. Dr. Márcio Lopes Miranda**

co-orientador: **Prof. Dr. Joaquim Murray Bustorff Silva**

***“ACUTE KIDNEY INJURY DURING SURGICAL CO₂
PNEUMOPERITONEUM IN YOUNG RATS”***

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção do título de Doutor em Ciências.

“Doctorate thesis presented to the Surgery Sciences Postgraduation Program of the School of Medical Sciences of the University of Campinas to obtain the Ph.D grade in Sciences.”

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida pelo aluno Rogério Fortunato de Barros e orientada pelo Prof. Dr. Márcio Lopes Miranda

Prof. Dr. Márcio Lopes Miranda

CAMPINAS

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

B278a Barros, Rogério Fortunato de, 1978-
Avaliação do impacto do pneumoperitônio cirúrgico
com CO₂ sobre o parênquima renal de ratos jovens /
Rogério Fortunato de Barros. -- Campinas, SP : [s.n.],
2012.

Orientador : Márcio Lopes Miranda.
Coorientador : Joaquim Murray Bustorff-Silva.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Laparoscopia. 2. Ratos. 3. Pneumoperitônio. 4.
Lesão renal aguda. 5. Lipocalina associada à gelatinase
de neutrófilos (NGAL). I. Miranda, Marcio Lopes. II.
Bustorff-Silva, Joaquim Murray, 1957-. III. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Acute kidney injury during surgical CO₂ pneumoperitoneum in young rats.

Palavras-chave em inglês:

Laparoscopy

Rats

Pneumoperitoneum

Acute Kidney Injury

Neutrophil gelatinase-associated-lipocalin (N-GAL)

Área de concentração: Ciências da Cirurgia

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora:

Márcio Lopes Miranda [Orientador]

Antônio Gonçalves de Oliveira Filho

Leonardo Oliveira Reis

Jovelino Quintino de Souza Leão

Lilian Monteiro Pereira

Data da defesa: 30-11-2012

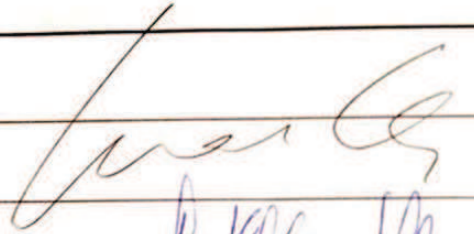
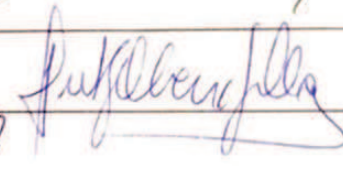
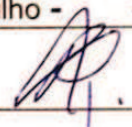
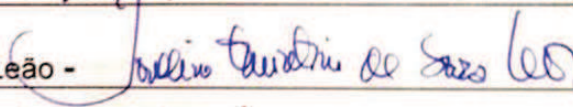
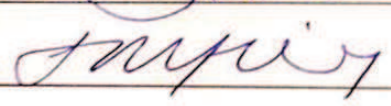
Programa de Pós-Graduação: Ciências da Cirurgia

Banca Examinadora da Defesa de Doutorado

Rogério Fortunato de Barros

Orientador: Prof. Dr. Márcio Lopes Miranda
Co-orientador: Joaquim Murray Bustorff Silva

Membros:

1. Prof(a). Dr(a). Márcio Lopes Miranda - 
2. Prof(a). Dr(a). Antonio Gonçalves de Oliveira Filho - 
3. Dr(a). Leonardo Oliveira Reis - 
4. Prof(a). Dr(a). Jovelino Quintino de Souza Leão - 
5. Prof(a). Dr(a). Lillian Monteiro Pereira - 

Curso de Pós-Graduação em Ciências da Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 30/11/2012

Aos meus pais,
Sr. Marcos Fortunato de Barros e Sra. Márcia Schröder,
responsáveis pelo alicerce de tudo que sou.

À minha noiva
Maria Cláudia Gallo
pelo estímulo, companheirismo e paciência.

Aos Pacientes e Cirurgiões Pediátricos.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Márcio Lopes Miranda, orientador, pela transmissão de conhecimento científico e princípios éticos no tratamento aos humanos e animais, um exemplo a ser seguido.

Ao Professor Dr. Joaquim Bustorff Silva, co-orientador, meu reconhecimento pela contribuição e desprendimento em transmitir seus ensinamentos.

Ao Professor Dr. Antonio Gonçalves de Oliveira Filho, Cirurgião Pediátrico exemplar, pelas inúmeras oportunidades de aprendizado de vida concedidas.

Ao Professor Dr. Gontijo, Chefe do Serviço de Nefrologia do Hospital de Clínicas da Unicamp, pela dedicação e colaboração em muitas etapas desta pesquisa.

Ao acadêmico do curso de Medicina da Unicamp Brayner Iorio, que colaborou em passos importantes na realização deste trabalho.

A todos os funcionários do Biotério e do Laboratório de Cirurgia Experimental da Unicamp, pela colaboração no manuseio e cuidado dispensados aos animais de experimentação. Aos biólogos Ana Cristina de Moraes e William A. Silva e aos técnicos de laboratório Ize, Dito, Bete, Miguel e Vinicius.

Aos meus “sempre mestres”, Dr. Nilton Crepaldi Vicente, Dr. Wilson Cassim, Dr. Nelson Cuccolichio, Dra. Marisa Bróglia, Dra. Ana Paula Melro, Dr. Eduardo Magnani, Dr. Gilson Sawaya, Dr. Hugo Olímpio, Dr. Geraldo Bueno, Dr. Luiz Henrique Pereira, Dr. Daniel Bittencourt, Dra. Marcia do Valle e Dra. Marcia Cavalaro pela habilidade na transmissão dos conhecimentos. Aos colegas de profissão Rodrigo Garcia, Lúcio Menezes e todos os residentes de Cirurgia Pediátrica e de Cirurgia Geral com quem eu tive o prazer de dividir

uma mesa de cirurgia. Ensinaaram-me na prática, dentre outras coisas, que o conhecimento deve sempre ser repartido e transmitido.

Ao meu tio, Dr. Rubens Giambroni Filho, exemplo de profissional incansável e dedicado.

Aos meus queridos irmãos Marcos Fortunato de Barros Filho e Rodrigo Fortunato de Barros, companheiros de todas as horas.

Aos meus Pais, Marcos Fortunato de Barros e Márcia Schröder pela educação, altruísmo e exemplos de vida.

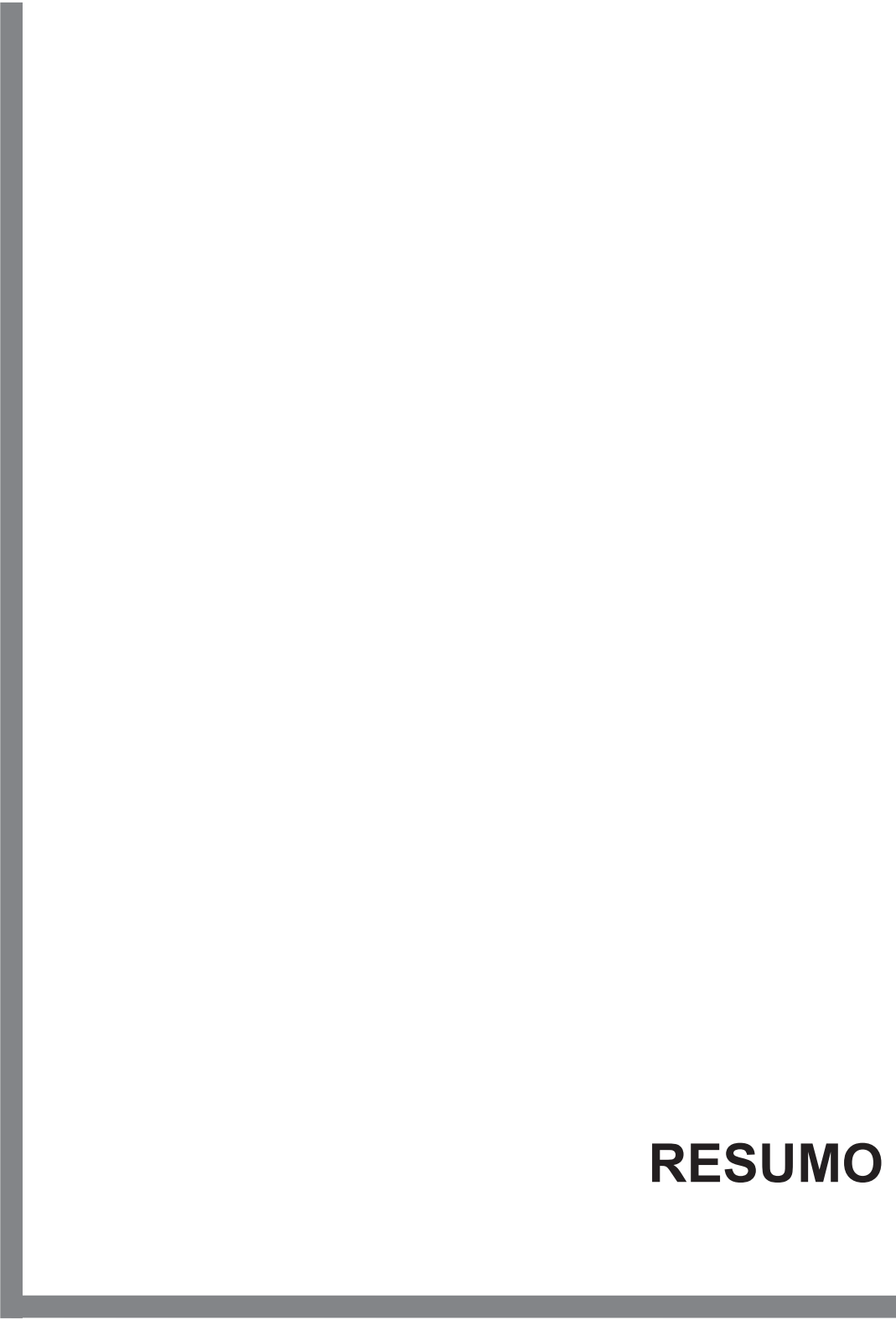
À minha noiva Maria Cláudia Gallo por não me deixar desistir facilmente, mesmo diante de obstáculos aparentemente intransponíveis. Pela paciência, amizade e companheirismo.

Aos ratos e a todos os animais de experimentação, pela doação silenciosa.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram da elaboração deste trabalho contribuindo para sua conclusão.

“Não há ensino sem pesquisa e pesquisa sem ensino.
Esses quefazeres que se encontram um no corpo do outro.
Enquanto ensino, continuo buscando, reprocurando.
Ensino porque busco, porque indaguei, porque indago e me indago.
Pesquiso para constatar, constatando intervenho,
intervindo educo e me educo.
Pesquiso para conhecer o que ainda não conheço e
comunicar ou anunciar a verdade.”

Paulo Freire



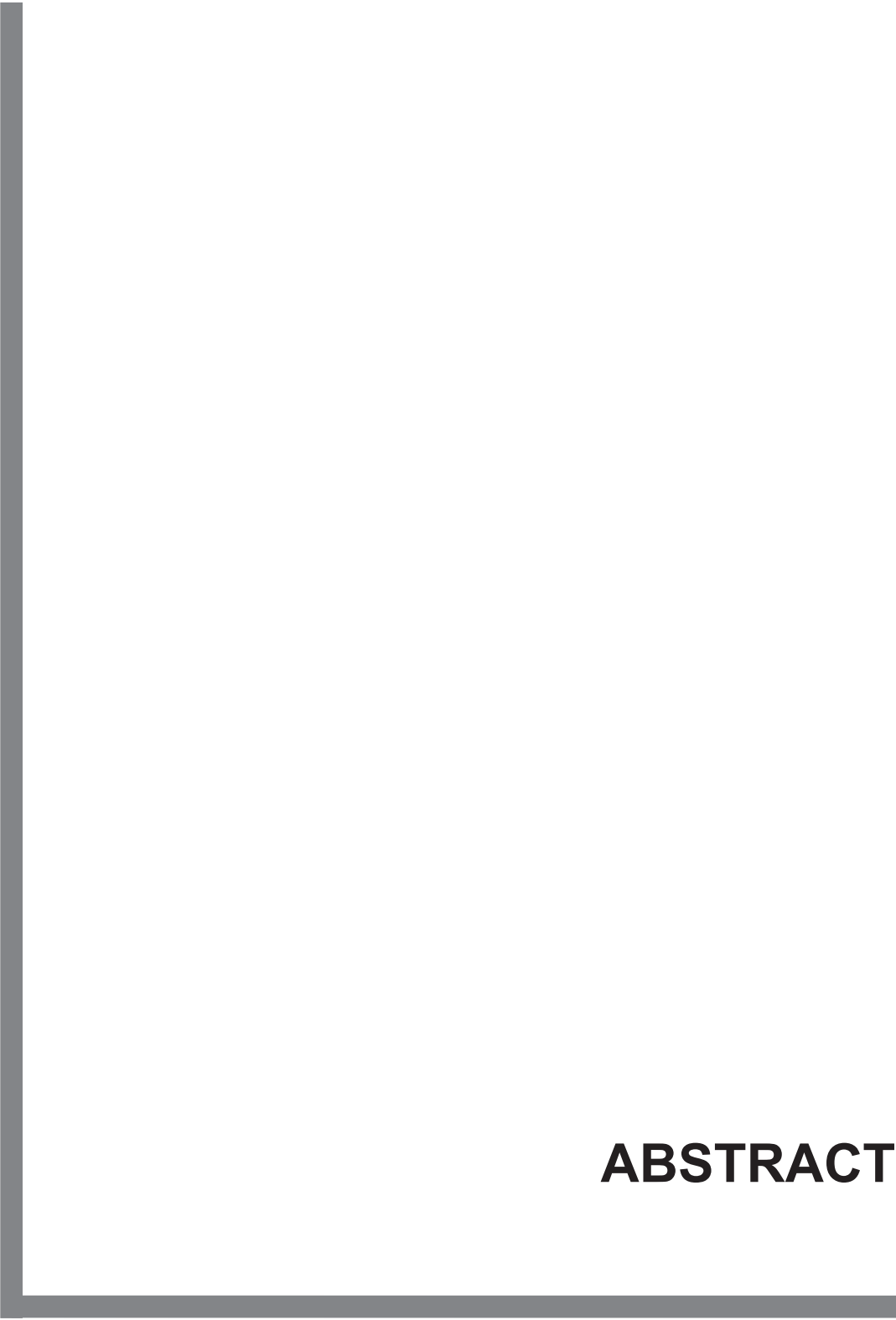
RESUMO

Objetivo: Elevações da pressão intra-abdominal durante o pneumoperitônio podem ocasionar oligúria ou anúria em mamíferos. Possível lesão renal decorrente ainda não foi bem documentada na literatura médica. O objetivo deste trabalho é avaliar o impacto do pneumoperitônio no parênquima renal em um modelo experimental de ratos jovens, através da expressão da *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (N-GAL), um biomarcador de lesão renal precoce.

Materiais e Métodos: Vinte ratos machos jovens *Sprague-Dowley* foram utilizados no trabalho. Dezesesseis ratos foram previamente anestesiados, traqueostomizados, flebotomizados e ventilados mecanicamente. Para análise, foram distribuídos em 4 grupos: Pneumoperitônio 1hora(h), Controle 1h, Pneumoperitônio 2h, Controle 2h. O quinto grupo, de quatro ratos, foi submetido à lesão renal através da administração de cisplatina para testar o biomarcador. Após 24h, todos os ratos foram submetidos à coleta de urina por 2 horas em gaiola metabólica; nefrectomia esquerda para quantificação por *western blotting* e nefrectomia direita para qualificação por imunofluorescência utilizando o biomarcador N-GAL.

Resultados: Os resultados foram analisados em 5 grupos de 4 ratos: Pneumoperitônio 1 e 2h, Controle 1 e 2h e Cisplatina. A expressão do N-GAL estava significativamente aumentada no grupo Cisplatina. Não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Pneumoperitônio 1 e 2h e Controle 1 e 2h ($P>0,05$).

Conclusão: O Pneumoperitônio controlado de 1 e 2 horas em ratos não promoveu lesão renal aguda.



ABSTRACT

Objective: Elevations of intra-abdominal pressure during pneumoperitoneum can lead to oliguria or anuria in mammals. Consequent kidney injury has not been well demonstrated in the literature. The aim of this study is to investigate the post-operative kidney status after pneumoperitoneum in a rat model through expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (N-GAL), an early kidney injury biomarker.

Materials and methods: Twenty male Sprague-Dowley rats were used in this experiment. Sixteen rats were previously anesthetized, tracheostomized, phlebotomized and mechanically ventilated were distributed in 4 groups: Pneumoperitoneum 1hour (h), Control 1h, Pneumoperitoneum 2h and Control 2h. The fifth group, composed of four rats, was kidney injured with cisplatin to test the biomarker. After 24 hours all rats were submitted to a urine 2 hours output measurement, left nephrectomy to western blotting quantification and a right nephrectomy to immunofluorescence qualification of N-GAL.

Results: The results were analyzed within 5 groups: Pneumoperitoneum 1 and 2h, Control 1 and 2h and Cisplatin group. The N-Gal expression was increased in the Cisplatin group. There weren't significant statistical difference between Pneumoperitoneum 1 and 2h and Control 1 and 2h groups ($P>0,05$).

Conclusion: The 1 and 2hours controlled pneumoperitoneum isn't related to acute renal injury.

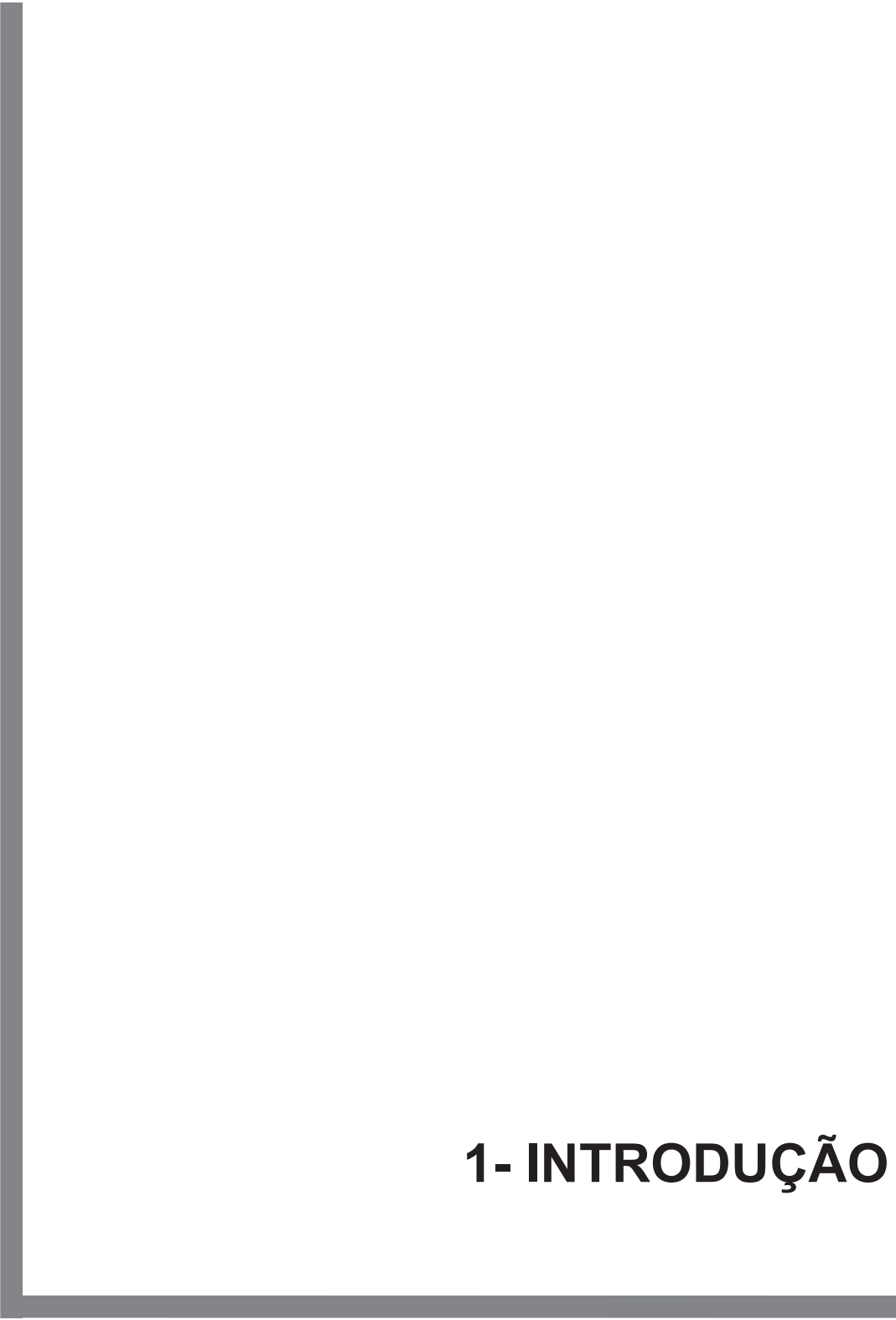
LISTA DE ABREVIATURAS

Cyr61	“Cysteine-rich protein” 61
g	Grama
h	Hora
kDa	kilodalton
KIM-1	“kidney injury molecule number one”
l/min	Litros por minuto
M	Molar
mmHg	Milímetros de mercúrio
N-GAL	“Neutrophil gelatinase-associated lipocalin”
PaCO₂	Pressão parcial de gás carbônico no sangue arterial
PIA	Pressão Intra Abdominal
rpm	Rotações por minuto
SatO₂%	Saturação de oxigênio no sangue
SDS-PAGE	Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio
W	Watts

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1- Representação esquemática das cirurgias nos grupos pneumoperitônio 1 e 2 horas com o sistema de válvula implantado.....	29
Figura 2 - Representação gráfica do débito urinário.....	34
Figura 3- Representação fotográfica da Imunofluorescência no grupo cisplatina.....	35
Figura 4- Representação fotográfica da Imunofluorescência no grupo controle e pneumoperitônio 2 horas.....	36
Figura 5- Representação gráfica dos resultados do <i>Western Blotting</i>	37
Figura 6- Representação gráfica das variações de pressão intra-abdominal.....	40

	Pág.
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
1- INTRODUÇÃO.....	17
2- OBJETIVO.....	24
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	26
3.1- Animais.....	27
3.2- Procedimento cirúrgico.....	27
3.3- <i>Western blotting</i>	30
3.4- Imunofluorescência.....	31
3.5- Análise estatística.....	32
4- RESULTADOS.....	33
5- DISCUSSÃO.....	38
6- CONCLUSÃO.....	43
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
8- ANEXOS.....	50



1- INTRODUÇÃO

Os procedimentos vídeo-assistidos tiveram início na Faculdade de Medicina de Viena em 1805, quando o médico alemão Dr. Bozzini apresentou o primeiro endoscópio para inspecionar a uretra humana sob visão direta, (Bozzini apud Mitre) [1]. Contudo, os passos iniciais em direção à cirurgia laparoscópica propriamente dita, aconteceram somente quase um século mais tarde pelo cirurgião Georg Kelling em 1901, introduzindo um cistoscópio através de um trocarte para examinar a cavidade abdominal de um cão. Durante a fase inicial desse procedimento, Kelling, utilizando uma agulha, insuflou a cavidade peritoneal com ar ambiente filtrado e observou as alterações dos órgãos diante do aumento de pressão abdominal [2,3].

Em 1910, Jacobaeus, um interno da Universidade de Estocolmo, aplicou a técnica proposta por Kelling para fins diagnósticos pela primeira vez em humanos e denominou-a de toraco-laparoscopia. O autor utilizou um trocarte com uma abertura para insuflação de ar como único portal de entrada, permitindo assim a produção de pneumoperitônio e a simultânea endoscopia da cavidade abdominal [2,3]. O desenvolvimento tecnológico posterior permitiu não só a realização de procedimentos diagnósticos como a realização de cirurgias complexas através desse método [2,3].

Nas últimas décadas, os procedimentos minimamente invasivos ganharam espaço na medicina por apresentarem várias vantagens em relação às cirurgias tradicionais. Enquanto os procedimentos convencionais são feitos com incisões amplas para a apresentação do campo operatório, a videocirurgia acontece com incisões de apenas alguns milímetros para a introdução de trocartes, por onde se inserem uma fibra óptica para a visualização das estruturas internas e os instrumentos que serão utilizados na cirurgia [1-3].

Para se ter uma boa visualização do campo de trabalho, insufla-se com o gás carbônico (CO₂), criando-se um espaço potencial que permite uma melhor manipulação dos instrumentos cirúrgicos. O CO₂ é o gás mais utilizado nas vídeo-cirurgias por ser facilmente absorvível, de baixo custo e não inflamável.

Além da toracoscopia e laparoscopia, a vídeo-cirurgia pode ser utilizada também em partes moles, como o retroperitônio, o subcutâneo e as cavidades que já contém líquido, como os ventrículos cerebrais e a bexiga [1-4].

A vídeo-cirurgia, devido às mínimas incisões, evita a secção dos planos das paredes abdominal e torácica, evitando lesões em músculos, nervos e pequenos vasos, resultando num melhor efeito estético. Além disso, permite menor uso de analgésicos, menor tempo de internação, consequente menor gasto hospitalar e um retorno precoce às suas atividades de rotina [5].

O aumento da pressão intra-abdominal causado pela insuflação de CO₂ provoca alterações sistêmicas, como a diminuição do débito cardíaco e do débito urinário [5]. A compressão sobre a aorta, por sua vez, aumenta a resistência vascular periférica e a pós-carga. A compressão sobre as veias, sistema de alta complacência e baixa resistência, sofre influência importante do pneumoperitônio, com redução do retorno venoso e da pré-carga além de sequestro de sangue nas extremidades inferiores. O aumento da pós-carga e a diminuição da pré-carga tendem a reduzir o volume sistólico e consequentemente o débito cardíaco. Este fato pode ser agravado ou atenuado pelo estado de hidratação prévio do paciente, pelo posicionamento em céfalo-ative (agravado) ou céfalo-declive (atenuado) e pelo valor da pressão de insuflação. Diversos autores consideram a pressão de insuflação máxima segura de 15mmHg em adultos e 10mmHg em crianças. Dependendo da combinação desses fatores, a redução do débito cardíaco pode, no entanto, chegar a atingir até 50% [6]. Observa-se também o aumento nas concentrações de catecolaminas, hormônios do sistema renina-angiotensina-aldosterona e, principalmente, vasopressina [6]. A dinâmica pulmonar também é afetada, a elevação do diafragma diminui a capacidade residual funcional e a complacência pulmonar. Dependendo da posição, do grau de céfalo-declive do paciente e da pressão intra-abdominal, pode reduzir-se à metade do normal. As regiões basais pulmonares, comprimidas pela elevação diafragmática devido ao pneumoperitônio, podem apresentar atelectasias que aumentam o espaço morto e desequilibram a relação ventilação/perfusão

ocasionando *shunt* e aumentando a pressão arterial em CO₂ (PaCO₂) [6]. O gás escolhido para o pneumoperitônio é o CO₂, gás altamente solúvel que reduz o risco de embolia gasosa. Seu uso aumenta a PaCO₂ também pela absorção, podendo ocasionar acidose respiratória como consequência [6]. Pressões intrapulmonares muito elevadas, maiores que 40mmHg, aumentam a pressão no território da artéria pulmonar, diminuindo o enchimento do átrio e ventrículo esquerdos afetando ainda mais a pré-carga e consequentemente o débito cardíaco. É recomendável que se use ventiladores que proporcionem a modalidade de ventilação por pressão controlada pelo risco de barotrauma associado. A monitorização do CO₂ expirado pela capnometria é essencial e obrigatória de acordo com o art. 3º inciso III da Resolução 1802/2006 do Conselho Federal de Medicina. O relaxamento muscular adequado é de fundamental valor para o sucesso da operação, visto que praticamente todas as complicações decorrentes da técnica laparoscópica se correlacionam com o aumento da pressão intra-abdominal [6].

Em estudo realizado com 30 crianças, onde o débito urinário foi avaliado após cirurgia laparoscópica, todas apresentaram diminuição da diurese após curto período de pneumoperitônio [7]. Os mecanismos através dos quais o pneumoperitônio provoca oligúria ainda não foram completamente esclarecidos, podendo relacionar-se à diminuição do fluxo sanguíneo renal devido à compressão do pedículo vascular renal; secreção da produção de hormônio antidiurético e outros hormônios sistêmicos; aumento da resistência vascular ou ainda compressão renal e/ou ureteral direta [8,9].

McDougall et al. (1996) relataram diminuição no “*clearance*” de creatinina após 2 horas de insuflação em porcos mantidos em uma pressão de pneumoperitônio de 15mmHg [9]. Kirsh et al. (1994) encontraram resultados similares a McDougall em ratos num modelo de 1,2 e 4 horas mantidos numa pressão de 10mmHg [8].

Guler et al. (1998) relataram os efeitos agudos da insuflação retroperitoneal de CO₂ nos rins de coelhos numa pressão de 10mm de Hg em grupos de 2 e 4 horas. Observaram significativa elevação dos níveis de creatinina sérica ao final do procedimento, elevação essa mais evidente no grupo submetido a 4 horas de insuflação quando comparado ao grupo de 2 horas. Esses dois grupos também apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle, cujos animais não haviam sofrido insuflação. Os grupos não mostraram diferença estatística quando avaliados após 24 horas, ocasião em que os níveis séricos de creatinina tinham retornado ao normal em todos os animais [10].

Em outro estudo com porcos, cateteres foram introduzidos no córtex e medula do rim esquerdo, sendo seguido por insuflação intraperitoneal com CO₂ numa pressão entre 16 e 18mm de Hg, mantido por 4 horas, seguido por rápida desinsuflação. Marcadores de isquemia (glicose, lactato, piruvato e razão lactato-piruvato) e de lesão da membrana celular (glicerol) foram avaliados por cerca de 2 horas. As amostras coletadas através dos cateteres não mostraram alterações nos marcadores de isquemia nem no córtex nem na medula. Por outro lado, houve aumento nos marcadores de lesão da membrana celular após a desinsuflação, como o glicerol na porção renal medular. Este achado de lesão transitória não isquêmica poderia ser explicado por alterações na reperusão do órgão, bem como pela compressão e descompressão da célula [11].

A obstrução ureteral causada por compressão extrínseca não pareceu estar relacionada com a oligúria em pacientes com pneumoperitônio. Cateteres ureterais já foram colocados durante cirurgias laparoscópicas e não houve alterações na presença de débito urinário durante o procedimento. A urografia excretora realizada em animais durante o pneumoperitônio também não demonstrou obstrução ureteral [12,13].

Além da oligúria comprovada em mamíferos, o pneumoperitônio com insuflação de dióxido de carbono foi também responsável por alterações hemodinâmicas sistêmicas e alterações dos níveis de cortisol,

fatores inflamatórios e marcadores de lesão tissular. Aumento comprovado tanto nos peritônios parietal, quanto no visceral [14,15].

O pneumoretroperitônio unilateral, por sua vez, parece causar menos alterações hemodinâmicas. No entanto, a oligúria foi demonstrada em trabalho experimental realizado com porcos nos quais foi demonstrado diminuição de 60% do fluxo superficial renal, o qual retornou para níveis pré-insuflação logo após a liberação da pressão peri-renal [16].

Uma ferramenta que vem se tornando útil para a detecção precoce de lesões renais agudas na última década são os marcadores biológicos [17]. O termo indicador biológico (ou biomarcador) é utilizado em sentido lato para representar qualquer medida que reflita uma interação entre um sistema biológico e um agente ambiental, quer este seja químico, físico ou biológico [17,18].

Tradicionalmente foram utilizados os níveis séricos de creatinina e uréia, além da presença de glicosúria e proteinúria tanto para a detecção do déficit funcional quanto para o acompanhamento da evolução da lesão tissular renal. A creatinina, exame sérico que fornece uma estimativa do grau de filtração glomerular renal, conforme descrito por Shemesh et al. (1985), não tem sensibilidade para a detecção precoce de lesão [17,18].

No início deste século surgiram as primeiras publicações de biomarcadores de lesão renal precoce, destacando-se entre eles o N-GAL (*Neutrophil gelatinase-associated lipocalin*), o KIM-1(*kidney injury molecule number one*), e a Interleucina-8 [17,19-24].

O N-GAL ou em português, lipocalina associada a gelatinase de neutrófilos, possui 25kDa de peso molecular, é membro da família das lipocalinas e tem sua expressão aumentada nos túbulos renais no período pós-isquêmico em rins de ratos [19].

As lipocalinas constituem uma família de mais de 20 pequenas proteínas definidas pela sua constituição básica de estrutura tridimensional característica. Por definição, essas proteínas têm a eficiência de proteínas

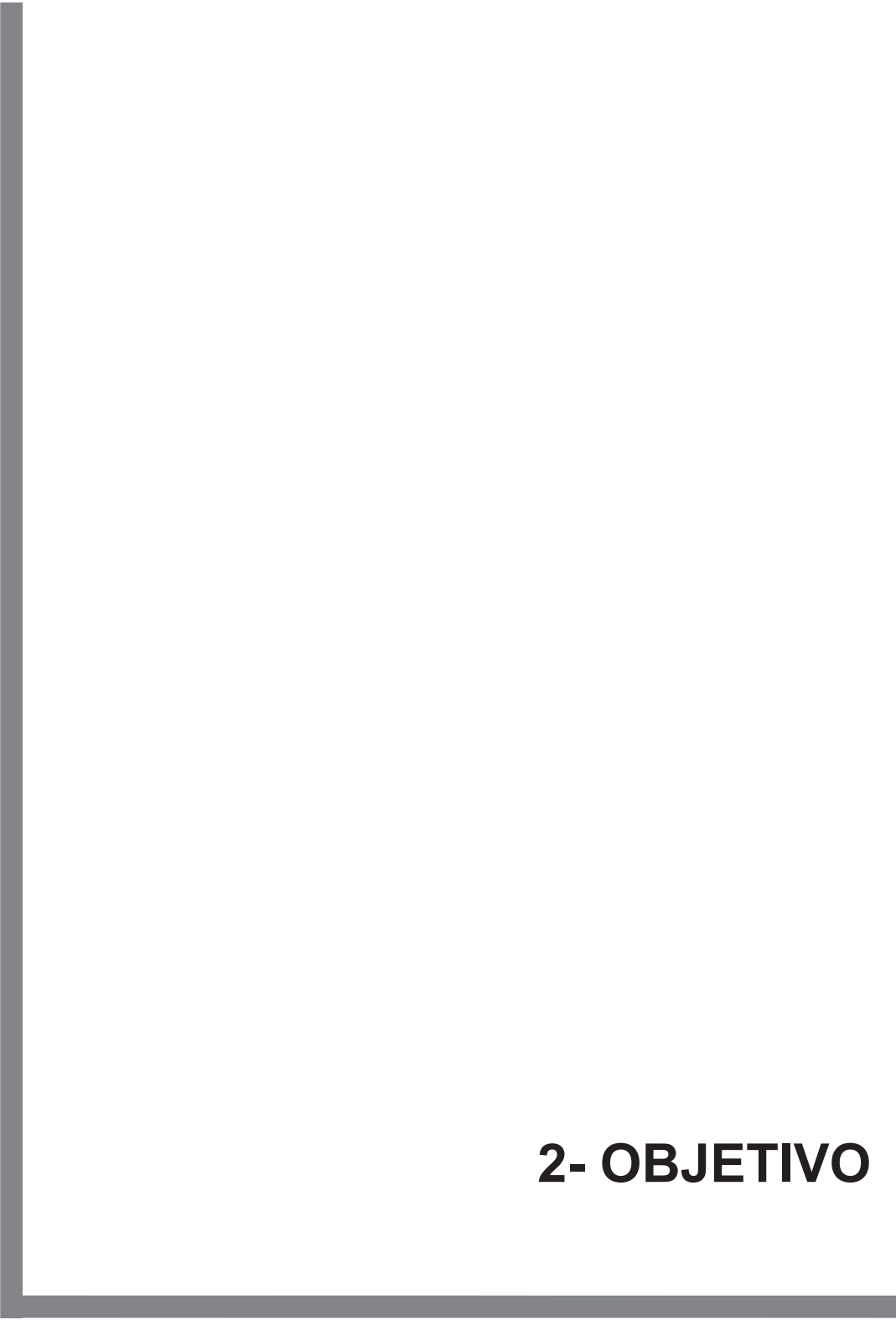
carreadoras, transportando uma série de substâncias, como retinóides, ácido aracdônico, prostaglandinas, feromônios, esteróides e ferro [20].

Mishra et al. (2003) demonstraram aumento sérico e urinário em ratos, apenas 2 horas após administração de cisplatina, diferentemente da creatinina sérica que se elevou apenas 96 horas após a lesão renal [19,20].

Em outro trabalho experimental realizado em ratos portadores de lesão renal induzida por cisplatina, a expressão do KIM-1 foi testada no rim e na urina utilizando o método *Western Blotting* e Imunofluorescência. A expressão do KIM-1 foi elevada com diagnóstico de lesões tipo necrose em células tubulares apenas 3 horas após a administração da cisplatina [21].

O entendimento detalhado dos efeitos do pneumoperitônio sobre os diversos órgãos e sistemas é especialmente importante devido à crescente complexidade e ao aumento do tempo cirúrgico nos procedimentos laparoscópicos [3,5-6]. A indicação da via de acesso laparoscópica em patologias urológicas e cirurgias mais complexas tem se tornado com o tempo, mais comum. Grande parcela destes pacientes tem comprometimento da função renal e apesar da oligúria associada à laparoscopia ser fenômeno bem conhecido na literatura, os trabalhos publicados não evidenciaram lesão renal permanente após a laparoscopia [7].

Conhecer as reais influências do pneumoperitônio por CO₂ nos mamíferos permitirá ao cirurgião minimizar os riscos e maximizar as vantagens da via de acesso laparoscópica.



2- OBJETIVO

Avaliar o impacto do pneumoperitônio cirúrgico controlado com CO₂ sobre o parênquima renal de ratos jovens *Sprague-Dowley*.



3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1- Animais

Vinte ratos machos jovens *Sprague-Dowley* com cerca de 80 dias de vida, pesando entre 180 e 430 gramas (g), bom aspecto geral, ativos, sem evidência de doença à inspeção e liberados pelo veterinário do biotério. Os animais foram divididos em 5 grupos de 4 ratos: Pneumoperitônio 1 hora, Controle 1 hora, Pneumoperitônio 2 horas, Controle 2 horas e um quinto grupo que recebeu cisplatina 7,5mg/Kg via intravenosa sem anestesia como controle positivo de lesão renal precoce para testar a eficácia do biomarcador N-GAL. Este grupo foi chamado de Cisplatina. Os ratos dos grupos pneumoperitônio e controle 1 e 2 horas tinham entre 180 e 250g devido ao modelo do respirador utilizado (Anexo 5).

Durante o período do estudo os ratos permaneceram no biotério da Unicamp sob as normas vigentes no Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA); e liberados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA - certificado #1541-1) do Instituto de Biologia da Unicamp. Os animais foram confinados em gaiolas em camas de maravalha com número máximo de cinco ratos por caixa; mantidos durante todo o período de observação no biotério sob condições padronizadas de laboratório; temperatura entre 20 e 24°C, umidade relativa entre 50 e 60%, luz controlada (ciclo dia/noite de 12 horas: 8horas/20horas); alimentados com ração padrão para a espécie (Nuvital®) e água filtrada e clorada *ad libitum*.

3.2- Procedimento cirúrgico

Todos os animais dos grupos pneumoperitonio e controle 1 e 2h permaneceram 6 horas de jejum e foram anestesiados com infusão intravenosa de Ketamina/Xilasina na dosagem de 75mg/Kg e 5mg/Kg, respectivamente. A manutenção do ato anestésico foi realizada por via intravenosa, e com esporádicas infusões intraperitoneais quando o animal “superficializava” durante o procedimento. Os animais foram submetidos à tricotomia do abdome e flanco

esquerdo e posicionados em decúbito dorsal horizontal numa prancha de cortiça, com os quatro membros fixados à mesa cirúrgica.

Foi realizada uma traqueostomia cirúrgica utilizando um *abocath*®16. Os ratos foram ventilados mecanicamente com ar ambiente enriquecido com oxigênio 4l/min utilizando um ventilador tipo pistão para roedores (*Harvard Apparatus*® *Model 687*). O volume e a frequência utilizada no ventilador seguiram as normas do gráfico volume/peso e frequência para mamíferos de laboratório obtidos na revisão do ventilador.

Foi realizada a cateterização da artéria femoral com um *abocath*®22, utilizada para duas mensurações da saturação de oxigênio durante os procedimentos; uma no início e outra no final do procedimento. Em seguida foi realizada uma punção abdominal na fossa ilíaca esquerda utilizando um *abocath*®16, elevando-se o peritônio para evitar a perfuração de estruturas intra-abdominais.

A pressão intra-abdominal foi regulada em 10mmHg utilizando um insuflador modelo *SmithNephew*® *model 15 Dyopneumatic* acoplado a um sistema de válvula desenvolvido em nosso laboratório [26] (Figura 1), que manteve a pressão estável durante todo o procedimento.

No final do procedimento cirúrgico a artéria femoral foi ligada, e a traquéia foi cuidadosamente suturada com um ponto em “U” de prolene 6,0.

Nos animais do grupo Cisplatina não houve anestesia. Não foram realizadas traqueostomia, flebotomia ou punção abdominal. Apenas a infusão intravenosa de cisplatina na dose de 7,5mg/Kg para induzir lesão renal precoce em 4 ratos.

No dia seguinte ao procedimento, os ratos de todos os grupos permaneceram 2 horas em gaiola metabólica para coleta de urina. Todos os ratos foram alimentados com ração padrão para a espécie (*Nuvital*®), água filtrada e clorada *ad libitum*.

Ao completar 24 horas do primeiro procedimento, os ratos foram novamente anestesiados com infusão intravenosa de Ketamina/Xilasina na dosagem de 75mg/Kg e 5mg/Kg, respectivamente, e realizado a nefrectomia esquerda. Seguindo as padronizações do laboratório, foi separado apenas um oitavo do rim, para centrifugação e posterior análise de *Western Blotting*.

Foi realizada infusão intra-cardíaca por 15 minutos de solução de heparina 5% em bomba de infusão em baixa pressão, seguido de 60 minutos de paraformaldeído 4%. Os ratos foram sacrificados no início da infusão intra-cardíaca de paraformaldeído com a aspiração do sangue residual após a abertura do átrio direito. Foi realizada, por fim, a nefrectomia direita e os rins foram fixados em paraformaldeído 4% para a posterior análise da imunofluorescência.

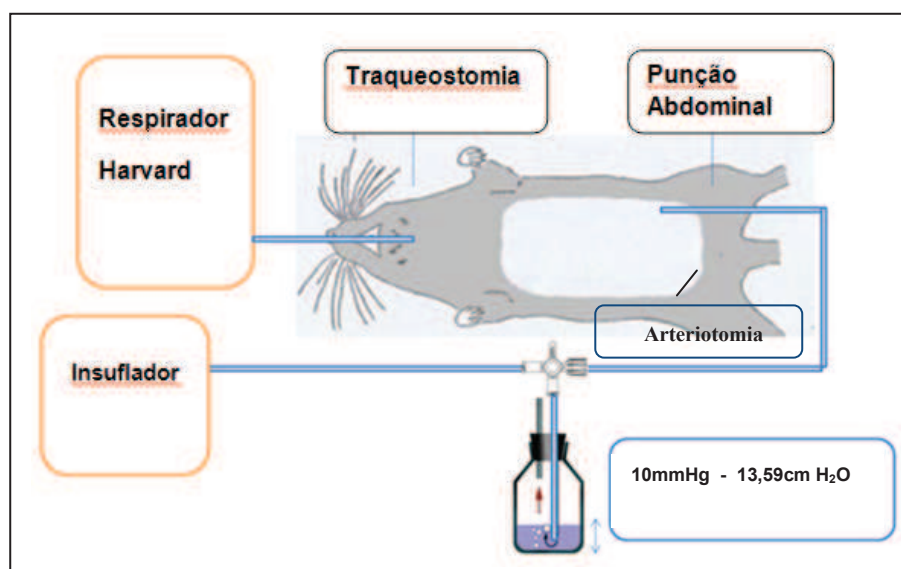


Figura 1- Representação esquemática das cirurgias nos grupos pneumoperitônio 1 e 2 horas com o sistema de válvula implantado para manter a pressão estável. Unidade de conversão 1mmHg=1,359cm de H₂O.

3.3- Western Blotting

Após a nefrectomia esquerda, o rim foi dividido em 8 partes iguais e 1/8 foi colocado imediatamente para trituração grosseira e homogeneizada imediatamente em 10 volumes de solução tampão (10ml/L Triton-X 100, 100mmol/L Tris[hydroxymethyl]metano-amino (Tris) pH 7.4, 10mmol/L pirofosfato de sódio, 100mmol/L fluoreto de sódio, 10mmol/L ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), 10mmol/L vanadato de sódio, 2mmol Fluoreto de Fenilmetilsulfonil (PSMF) e 0.1mg/ml aprotinina a 4°C), utilizando um *polytron*® PTA 20S gerador (modelo PT 10/35, *Brinkmann Instruments, Westbury, N.Y., USA*). O tecido retirado triturado foi centrifugado na velocidade de 11.000rpm a 4°C por 40 minutos e o sobrenadante usado como amostra.

A quantificação da proteína foi realizada pelo método ELISA. As amostras de tecido e amostras de extrato total (cerca de 250mg) foram submetidas à SDS-PAGE (Extração e análise eletroforética em gel de poliacrilamida - dodecil sulfato de sódio). Após separação eletroforética, as proteínas foram transferidas para as membranas de nitrocelulose e submetidas à transferência com anticorpo específico. As amostras foram tratadas com tampão de *Lemli* contendo 100mmol/l Ditioneitol (DTT), aquecido em banho de água fervente por 4 minutos e submetidos a 8% (SDS-PAGE) num *Bio-Rad* aparato de minigel (*Mini-Protean, Bio-Rad*). A transferência elétrica das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi realizada por 90 minutos a 120volts (constante) num *Bio-Rad* aparato de transferência em miniatura (*Mini-Protean*). A ligação não-específica da proteína na nitrocelulose foi reduzida realizando-se a pré-incubação do filtro por 2 horas a 22°C em tampão de bloqueio (5% leite desnatado em pó, 10mmol/l Tris, 150mmol/l NaCl, e 0.02% *Tween 20*).

As membranas de nitrocelulose foram incubadas a 4°C durante 12 horas com anticorpo primário N-GAL diluído na proporção de 1:500 em tampão de bloqueio (3% leite desnatado em pó, 10mmol/l Tris, 150mmol/l NaCl, e 0.02% *Tween 20*).

As bandas imunorreativas foram detectadas utilizando o método de transferência por quimioluminescência melhorado (RPN 2108 ECL *Western Blotting* sistema de análises; *Amersham Biosciences*), e documentadas por radiografia utilizando *Kodak XAR* filme (Eastman Kodak, Rochester, NY) com *Cronex Lightning Plus* monitor intensificador (*Dupont, Wilmington, DE*) por 60 minutos. As imagens das radiografias foram escaneadas (*Epson Stylus 3500®*) e as intensidades das bandas foram quantificadas por densitometria ótica (*Un-Scan-It gel - Version 6.1*) das radiografias.

3.4- Imunofluorescência

Os animais foram perfundidos por punção cardíaca com solução salina de heparina 5% por 15 minutos em bomba de infusão sob pressão constante. Este procedimento foi seguido de perfusão de 0.1M Tampão Fostafó (pH 7.4) contendo paraformaldeído 4% (w/v) e 0.1mol/L (M) sucrose por 60 minutos. Após a perfusão, o rim direito foi removido e fixado em 4% tampão fosfato formalina durante 24 horas para subsequente embebição de parafina. Os blocos de parafina foram cortados em 5- μ m de espessura e corados com *Sirius Red* para avaliar fibrose intersticial ou perivascular.

Para análise da imunofluorescência, o anticorpo *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* (N-GAL) foi utilizado. A expressão dessa proteína foi detectada utilizando o método biotina-avidina-peroxidase. Rapidamente, os cortes de 5- μ m de espessura foram desparafinizados encobertos por poli-L-lisina e tratados com 29% H_2O_2 em tampão fosfato salino por 15 minutos, leite por 60 minutos, anticorpo primário por 60 minutos e solução biotina-avidina-peroxidase (*Vector Laboratories Inc, CA, USA*, 1:1:50 diluição).

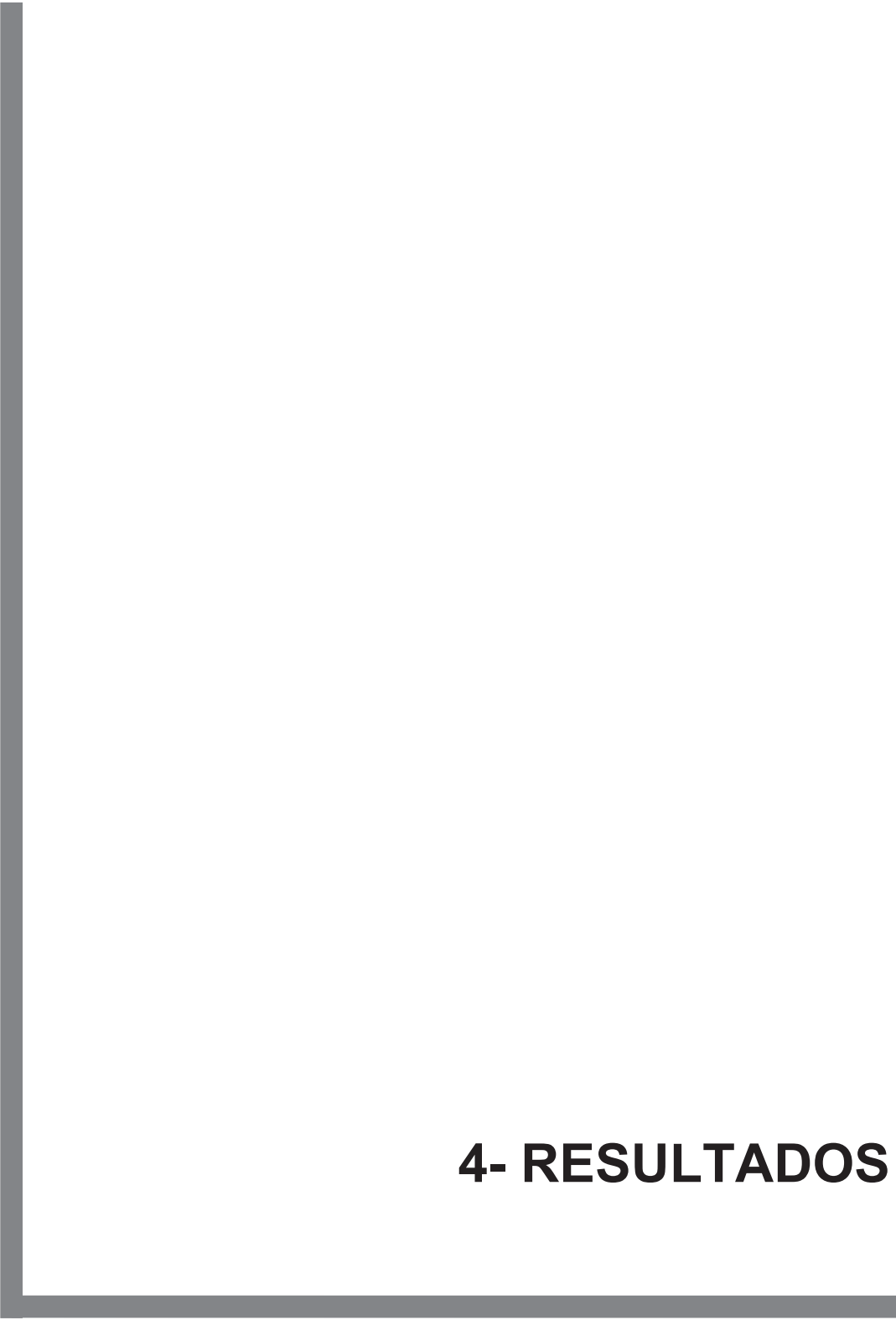
A recuperação do antígeno foi feita utilizando 0.01M tampão citrato (pH6.0) aquecido em micro-ondas (1300W) duas vezes de 5 minutos. Alcançado cores cromogênicas com 3,3-diaminobenzidina tetrahydroclorida (DAB, *Sigma-Aldrich Co.*, St. Louis MO, USA) como substrato para demonstrar os

locais de ligação da peroxidase. As lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris. Não foi observado imunoreatividade nos experimentos controle nos quais o anticorpo primário foi omitido.

3.5- Análise estatística

Os resultados do débito urinário e de *Western Blotting* para os grupos pneumoperitônio e seus respectivos controles 1 e 2 horas foram analisados utilizando o teste *Anova* acrescido do teste de *Tuckey* quando necessário, assumindo $p < 0,05$.

Para fins de padronização, os dados de *Western Blotting para o N-GAL* dos grupos pneumoperitônio e controle de 1 e 2 horas foram convertidos em porcentagem do grau de lesão obtido no grupo Cisplatina.



4- RESULTADOS

Durante o procedimento cirúrgico todas as amostras séricas colhidas da artéria femoral no início e final do procedimento para mensurar a saturação de oxigênio mantiveram resultados sempre acima de 90% nos ratos estudados. Nenhum rato apresentou sequelas ou dor devido à ligadura da artéria femoral, procedimento padrão do laboratório.

A análise do débito urinário, após 24 horas do procedimento inicial, identificou uma queda da produção de urina no grupo cisplatina ($p<0,05$). Os quatro demais grupos estudados apresentaram volume urinário adequado e não demonstraram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos Pneumoperitônio e Controle, 1 e 2 horas [34] (Figura 2, Anexo 4)

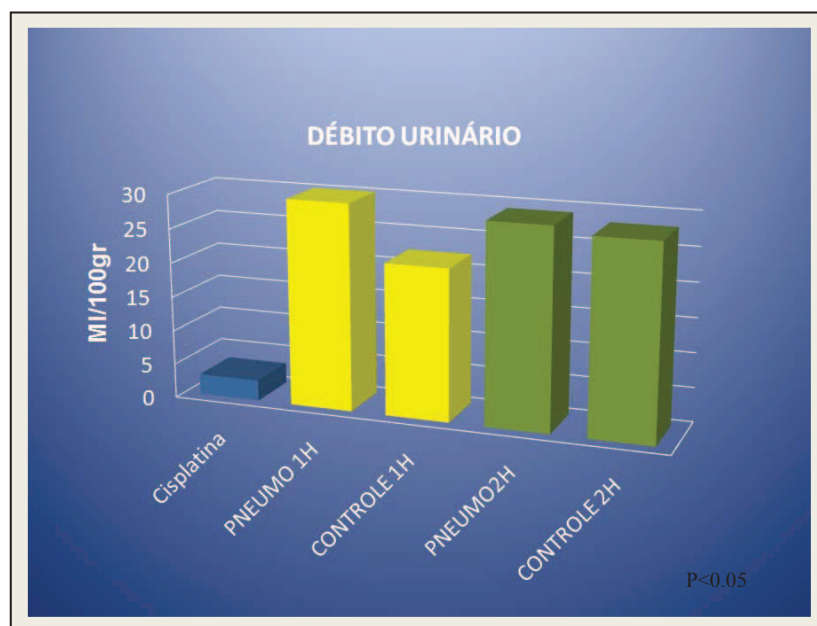


Figura 2- Representação gráfica do débito urinário dos diferentes grupos submetidos à coleta de urina por um período de 2 horas no dia seguinte do procedimento inicial.

A análise qualitativa da imunofluorescência pela expressão da proteína N-GAL demonstrou lesões tubulares e glomerulares significativas no grupo Cisplatina. A análise dos grupos pneumoperitônio e seus controles 1 e 2 horas identificou alterações que variaram de lesões focais até lesões moderadas e difusas, porém sem distinção significativa entre os grupos (Figuras 3 e 4).

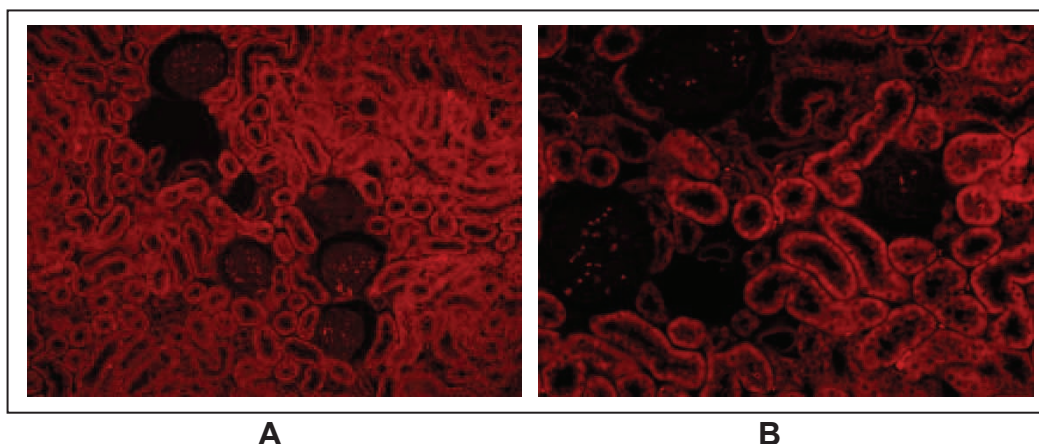


Figura 3- Representação fotográfica da Imunofluorescência no grupo Cisplatina demonstrando lesão tubular e glomerular com alta expressão da proteína N-GAL. **A**-20X e **B**-40X aumento

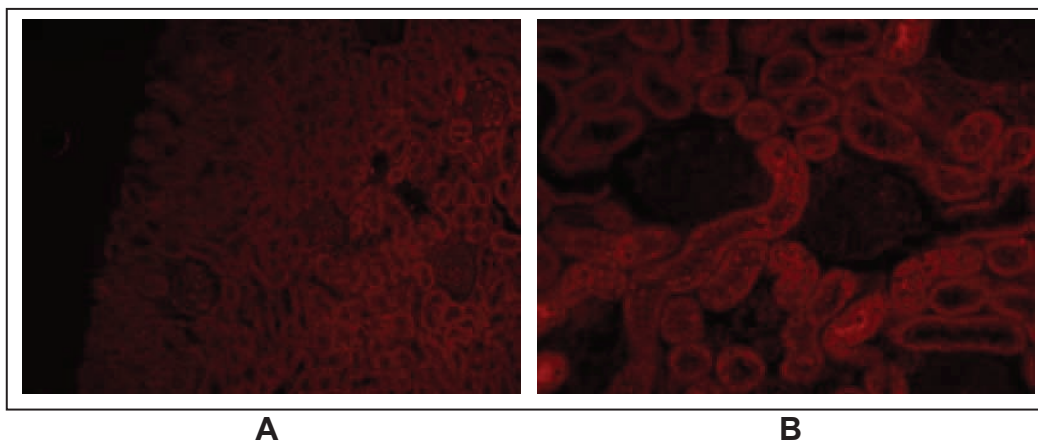


Figura 4- Representação fotográfica da Imunofluorescência no grupo Controle e Pneumoperitônio 2 horas demonstrando algumas lesões focais tubulares com expressão discreta da proteína N-GAL. **A-20X** em rato do grupo controle 2h e **B-40X** aumento em rato do grupo 2h pneumoperitônio

A análise quantitativa do N-GAL utilizando o *Western Blotting* identificou um aumento importante na expressão da proteína no grupo Cisplatina quando comparado aos demais grupos. Contudo, não foi observada diferença significativa entre os demais animais estudados ($p < 0,05$) (Figura 5).

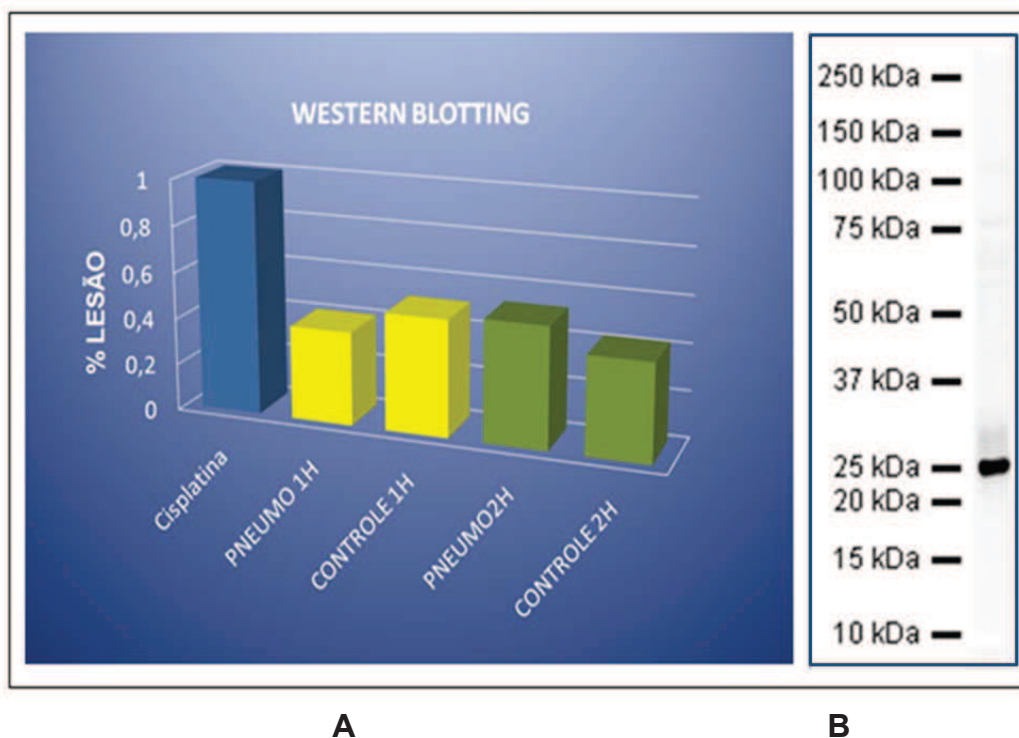
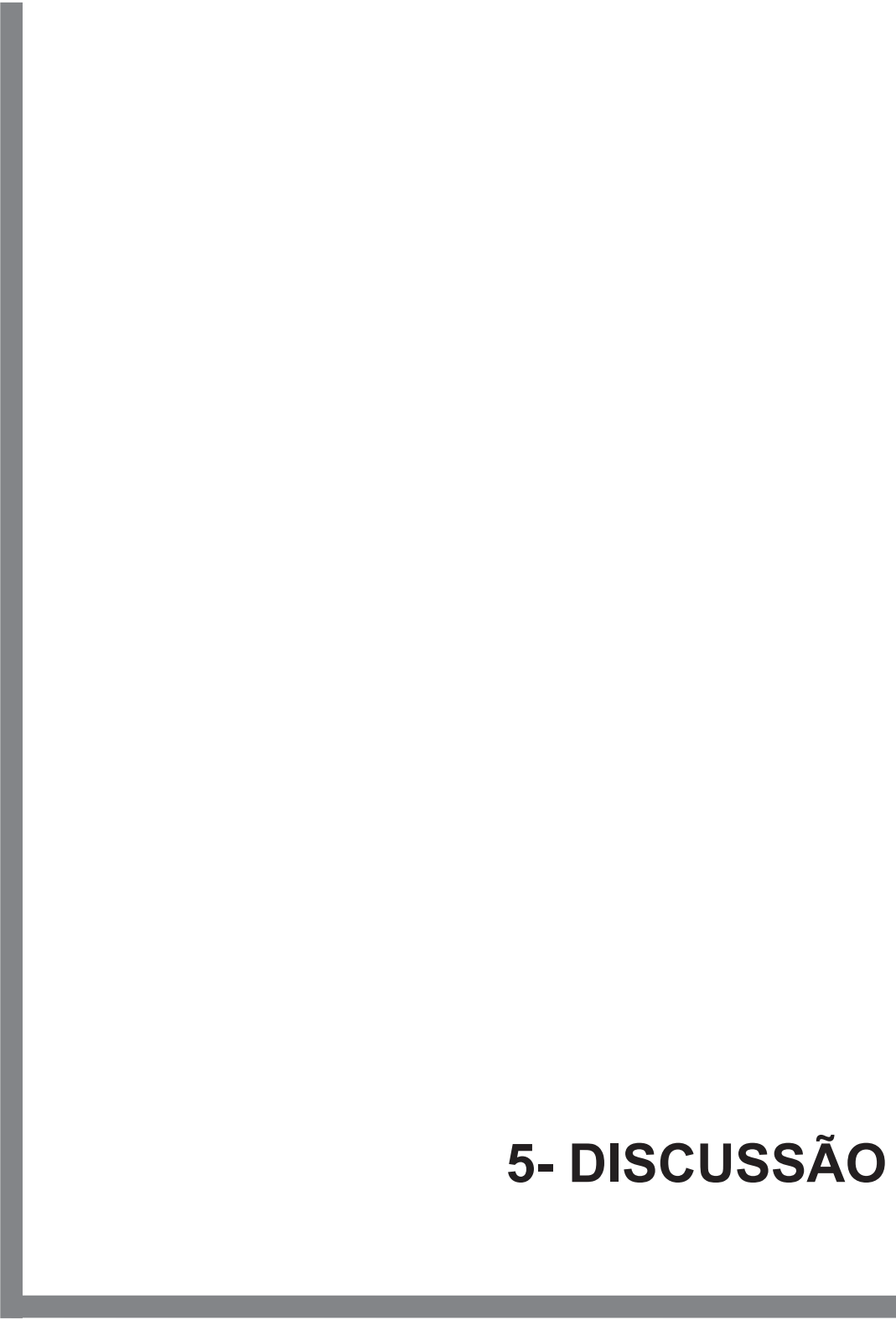


Figura 5-A- Representação gráfica dos resultados do *Western Blotting*. O grupo Cisplatina foi fixado como 100% de lesão para a utilização do método Anova. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos Pneumoperitônio e Controle 1 e 2 horas. **B-** *Western Blotting* demonstrando aumento importante da expressão da proteína N-GAL em um rato do grupo Cisplatina.



5- DISCUSSÃO

Apesar das inúmeras publicações estabelecendo relação causal do pneumoperitônio com a oligúria, não está bem documentado na literatura o possível comprometimento renal durante a laparoscopia. Lesões sub-clínicas poderiam estar associadas à via de acesso laparoscópica e, conseqüentemente, sub-diagnosticadas. Com o aumento do tempo cirúrgico e da complexidade das cirurgias vídeo assistidas, a definição de tempo e pressão limites para um possível momento de conversão da via de acesso laparoscópica para cirurgia aberta convencional, diminuiria consideravelmente a morbidade ao paciente e o conseqüente gasto hospitalar [25].

Inicialmente, durante a definição do modelo experimental padrão, houve alguns óbitos de animais devido à dificuldade do insuflador manter a pressão estável na pequena cavidade abdominal dos ratos. Por esse motivo, foi idealizado um sistema de válvula que mantém a pressão intra-abdominal estável, independentemente da pressão determinada no insuflador. Esse mecanismo valvular simples pode ser facilmente reproduzido em cirurgias de pequenos mamíferos, incluindo os seres humanos, caso o insuflador tenha uma baixa sensibilidade pressórica [26]. As pressões intra-abdominais foram analisadas com e sem o sistema de válvula acoplado e os níveis pressóricos encontrados antes da idealização deste aparato não eram compatíveis com uma cirurgia convencional como observado na figura 6 [26].

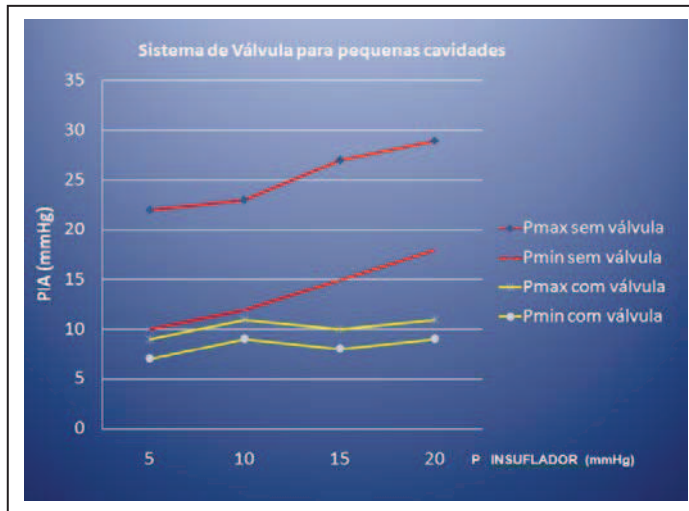


Figura 6- Representação gráfica das variações de pressão intra-abdominal, com e sem o sistema de válvula de estabilização de pressão.

Quando comparada a pressão arterial média de ratos (aproximadamente 80mmHg) com a pressão de outros mamíferos maiores (100-120mmHg), um pneumoperitônio de 10mmHg em pequenos roedores corresponde a uma insuflação de 15mmHg utilizada em humanos ou porcos [8,9]. Por esse motivo mantivemos a pressão intra-abdominal dos ratos do estudo em no máximo 10mm de Hg (corresponde à 13,59cm de água) [25-27].

Lindstrom et al. (2003) demonstraram a deterioração de 70% da filtração glomerular quando a pressão intra-abdominal (PIA) permaneceu mantida em 10mmHg em ratos [28]. Foi demonstrado que o aumento da PIA também diminui proporcionalmente o débito cardíaco, levando a redução do fluxo sanguíneo arterial esplânico, podendo ocasionar isquemia visceral, mais grave nos intestinos [29-30]. Outros estudos demonstraram que não apenas as pressões intra-abdominais elevadas geram repercussões sistêmicas, mas também a repetição do processo de insuflação e desinsuflação da cavidade abdominal, podem levar a oligúria e a produção de radicais livres de oxigênio que causam lesão tecidual, possivelmente explicando a alta taxa de mortalidade dos ratos antes de adotarmos o uso da válvula [30-32].

O fato de a PIA permanecer sempre estável, independentemente da pressão que se aplica no insuflador, é de extrema utilidade para os cirurgiões que trabalham com laparoscopia em cavidades pequenas. A estabilidade pressórica, por sua vez, pode ter tido um efeito de proteção nos rins estudados e futuros trabalhos podem ser realizados sem o sistema de válvula ou em mamíferos maiores para comparar com os resultados obtidos [26-32].

Durante as cirurgias, os ratos permaneceram em ventilação mecânica com ar ambiente enriquecido com oxigênio 4 litros por minuto e pneumoperitônio em 10mmHg estável com o uso da válvula, mimetizando assim as condições cirúrgicas de lactentes adequadamente anestesiados e conduzidos na laparoscopia. Esse cuidado diminuiu o viés de outras possíveis causas de lesão renal, como por exemplo, a hipóxia secundária à hipoventilação.

Os níveis da creatinina sérica podem variar muito com a idade, sexo, massa magra muscular, metabolismo do músculo e nível de hidratação dos pacientes. As concentrações séricas de creatinina em pacientes graves, podem não alterar seus valores até cerca de 50% da função renal já ter sido perdida [17,18].

A lesão renal precoce representa um problema devastador e significativo na medicina e pacientes podem ser beneficiados quando várias manobras são instaladas precocemente logo após a injúria inicial, bem antes da creatinina sérica apresentar alteração dos níveis basais do paciente [19,21]. Em estudo realizado com 71 crianças submetidas a “*by-pass cardiopulmonar*”, o N-GAL fez diagnóstico de lesão renal aguda precocemente em 20 crianças, permitindo o uso do cateter de *TenckHoff*® em apenas 2 horas. Sabe-se que, muitas vezes, as equipes de cirurgia cardíaca já implantam o cateter de diálise peritoneal profilaticamente para a condução do pós-operatório, sendo que o início tardio das diálises pode acarretar danos irreversíveis aos pacientes [23,34].

Os biomarcadores para detecção precoce de lesão renal aguda surgiram com mais impacto na década passada. Pequenos polipeptídeos protease resistente podem agora ser rapidamente detectados em amostras de sangue e

urina com a expressão da proteína de diversos e promissores biomarcadores: *Urinary Kidney Injury molecule-1* (KIM-1), N-GAL, *cysteine-rich protein 61* (Cyr61), clusterina, interleucina-18 e F-actina[19-24].

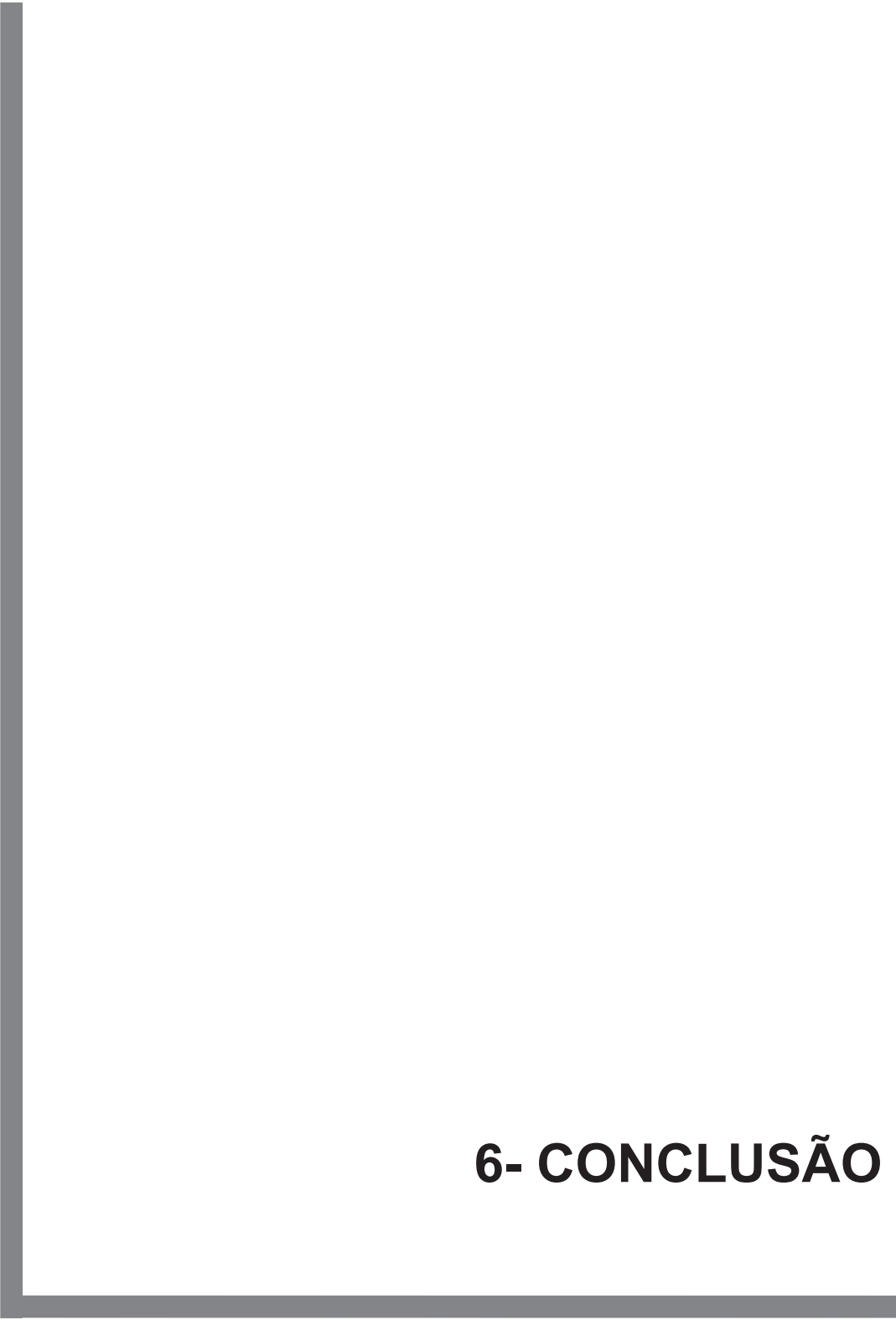
A proteína escolhida para este experimento foi o N-GAL, uma proteína de 25 kDa que pertence à família das lipocalinas. A posição de exame preditivo positivo do N-GAL tem sido profundamente estudada nos últimos anos. Sua expressão após ocorrido lesão isquêmica renal em dosagens séricas, urinárias ou biópsias inicia-se apenas 2 a 3 horas após o primeiro insulto nefrológico, possuindo sua expressão máxima nas seguintes 12-24 horas [19-22]. Teoricamente, o aumento progressivo do N-GAL nas células renais tubulares pode ser induzido pela liberação local de citocinas dos neutrófilos presos na microcirculação precocemente após injúria isquêmica [20-24].

Na nossa análise, a lesão renal foi identificada no grupo Cisplatina pela queda do débito urinário e confirmada pelo aumento significativo da expressão da proteína N-GAL, tanto na Imunofluorescência, quanto no *Western Blotting*, demonstrando a eficácia do biomarcador utilizando a técnica padrão de nosso laboratório.

A análise do Patologista foi realizada de maneira randomizada omitindo os grupos estudados. Com o auxílio da coloração hematoxilina-eosina, os achados encontrados no Departamento de Patologia foram compatíveis com os resultados do *Western Blotting*, não sendo possível a diferenciação dos grupos Pneumoperitônio e seus respectivos controle 1 e 2 horas na histologia.

A análise dos resultados obtidos reforça a segurança na realização de pneumoperitônio controlado em pequenos mamíferos, pois não houve confirmação de lesão nefrológica significativa neste modelo experimental.

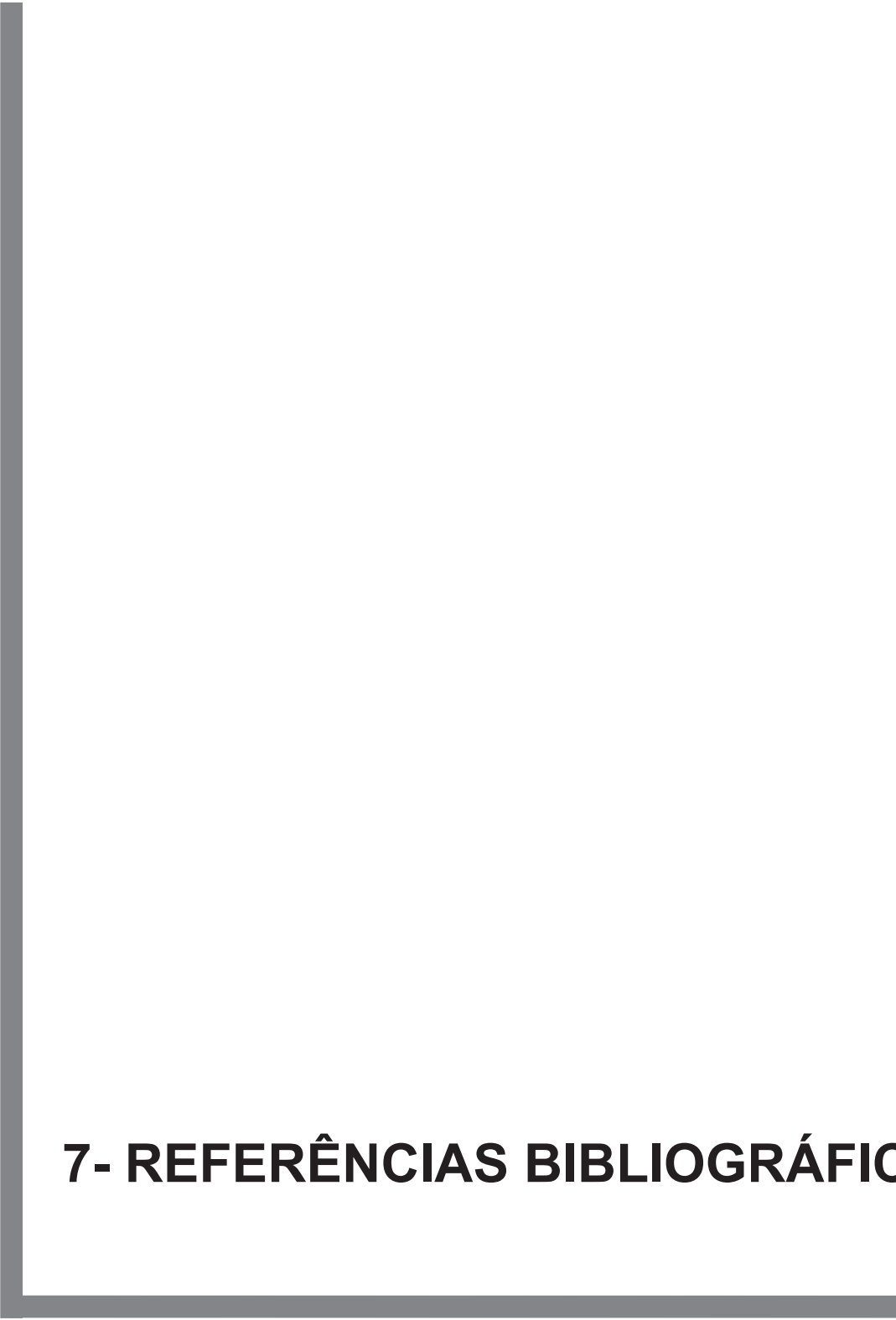
Estudos futuros utilizando outros biomarcadores, mamíferos maiores ou o prolongamento do tempo de pneumoperitônio, poderão ser realizados para esclarecer a resposta nefrológica ao pneumoperitônio e detectar possíveis lesões sub-clínicas.



6- CONCLUSÃO

O pneumoperitônio controlado de 1 e 2 horas utilizando ratos jovens não alterou o débito urinário 24 horas após o procedimento e também não promoveu alterações significativas na expressão do N-GAL como biomarcador de lesão renal precoce.

Portanto, o pneumoperitônio com pressão e tempo controlados mostrou ser um procedimento inócuo para a função renal em ratos.



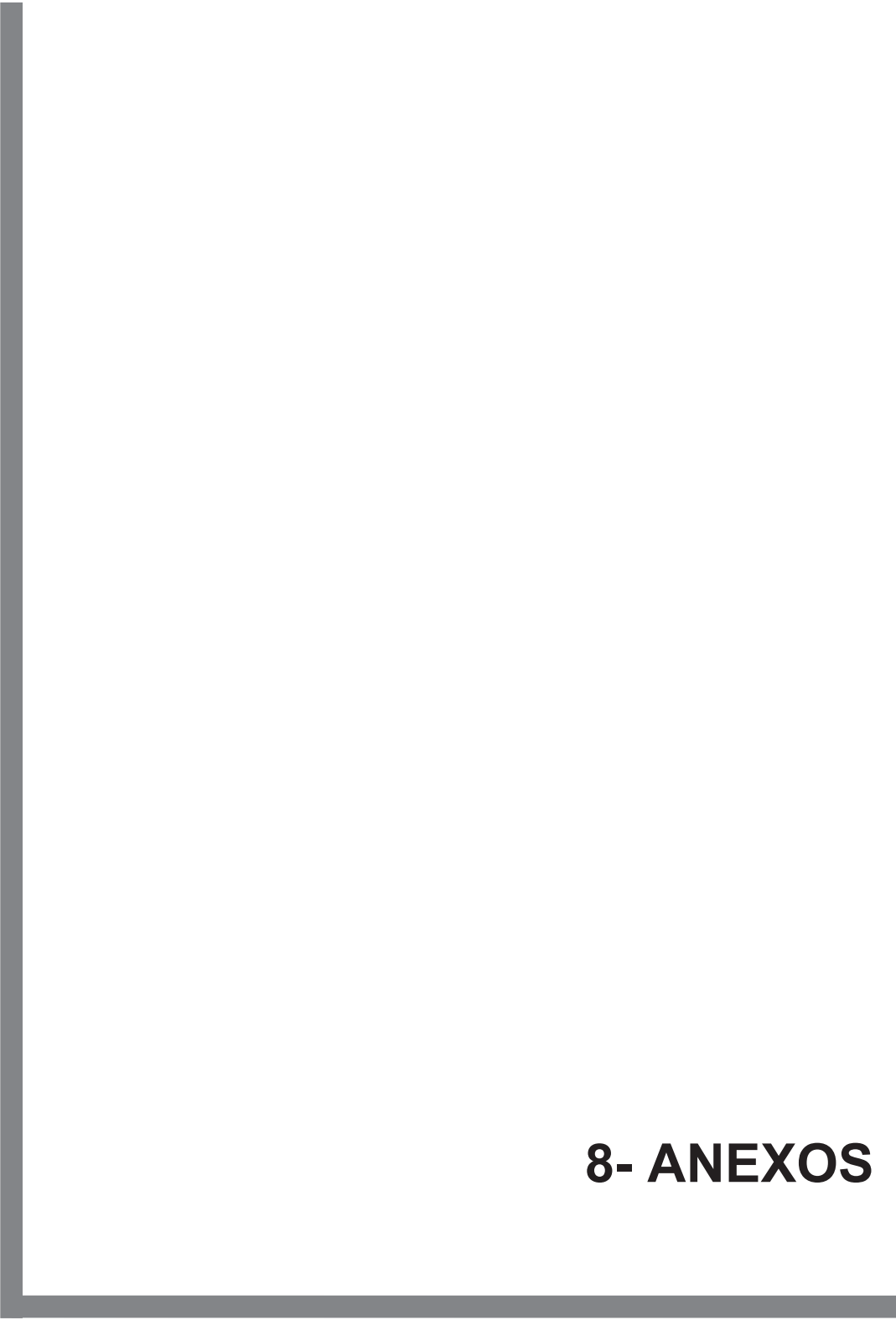
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Mitre AI, Arap S. Histórico. In: Castilho LN. (Ed.). Laparoscopia urológica. Campinas. 2000; LPC Comunicações, p.1-5.
- 2- Hima HS. Minimally invasive (laparoscopic) surgery. Surg. Endosc. 2002; v. 16: p. 1647-1652.
- 3- Stellato TA. History of laparoscopic surgery. Surg. Clin. North Am. 1992; v. 72, n. 5, p. 997-1002.
- 4- Irgau I, Abdel-Misih RZ, Fulda GJ. Pathophysiological effects of laparoscopy: current knowledge. Del. Med. J. 1997; v. 69, n. 10, p. 501-509.
- 5- Wellwood J, Sculpher MJ, Stoker S, Nicholls GJ, Geddes C, Whitehead A, et al. Randomised controlled trial of laparoscopic versus open mesh repair for inguinal hernia: outcome and cost. BMJ 1998; 317:103-110.
- 6- Correa MO, Brandão MJN, Hirata ES, Udelmann A. Considerações Anestésicas na Cirurgia Laparoscópica: Arq Bras Cir Dig 2008; 21(3) : 136-138.
- 7- Gomez Dammier BH, Karanik E, Gluer S, Jesch NK, Kubler J, Latta J, et al. Anuria during pneumoperitoneum in infants and Children: a prospective study. Journal of Pediatric Surgery 2005; 40:1454-1458.
- 8- Kirsh AJ, Hensle TW, Chang DT, Kayton ML, Olsson CA, Sawczuk IS. Renal effects of CO₂ insufflation: oliguria and acute renal dysfunction in a rat pneumoperitoneum model. Urology 1994; 43(4):453-459.
- 9- McDougall EM, Monk TG, Wolf JS, Hicks M, Clayman RV, Stephanie G, et al. The effect of prolonged pneumoperitoneum on renal function in an animal model. Journal of the American College of Surgeons 1996; 182:317-328.
- 10- Guller C, Sade MD, Kirkalli Z. Renal effects of carbon dioxide insufflation in rabbit pneumoretroperitoneum model. J. Endourol. 1998; v. 12, n. 4, p. 367-370.

- 11- Iwata T, Gilispie A, Jorns C, Yamamoto S, Nowak G, Ericzon B-G. Microdialysis monitoring for evaluation of the influence exerted by pneumoperitoneum on the kidney: an experimental study. *Surg Endosc.* 2007; Apr; 22(4):938-42.
- 12- Hedican SP. Laparoscopy in urology. *Surg Clin North Am* 2000; 80(5): 1465-1485.
- 13- Dunn MD & McDougall EM. Renal physiology: laparoscopic considerations. *Urol Clin North Am* 2000; 27(4):609-614.
- 14- Paparella A, Noviello C, Romano M, Parmeggiani P, Paciello O, Papparella S. Local and systemic impact of pneumoperitoneum on prepuberal rats. *Pediatric Surg Int.* 2007; 23(5):453-7.
- 15- Chang DT, Kirsch AJ, Sawczuk IS. Oliguria during laparoscopic surgery. *J Endourol* 1994; 8:349-352.
- 16- Chiu AW, Chang LS, Birkett DH, Babayan RK. The impact of pneumoperitoneum, pneumoretroperitoneum, and gasless laparoscopy on the systemic and renal hemodynamics. *Journal of the American College of Surgeons* 1995; 181:397-406.
- 17- Bellomo R, Kellum JA, Ronco C. Defining acute renal failure: physiological principles. *Intensive Care Med* 2004; 30:33-37.
- 18- Shemesh O, Golbetz H, Kriss JP, Myers BD. Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients. *Kidney Int.* 1985; v.28, n.5, p.830.
- 19- Mishra J, Derajavan P, Barash J, Yang T, Zahedi K, Mitsnefes M, et al. Identification of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Novel Early Urinary Biomarker for Ischemic Renal Injury. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14:2534-2543.

- 20- Derajavan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: new paths for an old shuttle. *Cancer Ther.* 2007; 5(B):463-470.
- 21- Vaidya V, Ramirez V, Ichimura T, Bobadilla NA, Bonventre JV. Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal* 2006; 290:517-529.
- 22- Ichino M, Kuroyanagi Y, Kusaka M, Mori T, Ishikawa K, Shiroki R, et al. Increased Urinary Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin Levels in a Rat Model of Upper Urinary Tract Infection. *The Journal of Urology* 2009; 181: 2326-2331.
- 23- Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mistnefes MM, Ma Q, Kelly C, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 2005; 365:1231
- 24- Mistnefes MM, Kathman TS, Mishra J, Kartal J, Khoury PR, Nickolas TL, et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in children with chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 2007; 22:101.
- 25- Brown NM, Helmer SD, Yates CL, Osland JS. The revised ACGME laparoscopic operative requirements: how have they impacted resident education? *SurgEndosc.*2012;
Disponível em: <http://www.springerlink.com/content/x93667u77p1j2568/>
- 26- Iorio B, de Barros RF, Miranda ML, de Oliveira-Filho AG, Bustorff-Silva JM. Evaluation of a simple valve mechanism used to stabilize intraabdominal pressure during surgically induced pneumoperitoneum in small animals. *Surg Endoscopy* 2012; 26(2):528-532.
- 27- Berguer R, Cornelius T, Dalton M. The optimum pneumoperitoneum pressure for laparoscopic surgery in the rat model - A detailed cardiorespiratory study. *Surg Endosc* 1997; 11:915-918.

- 28- Lindstrom P, Wadstrom J, Ollerstam A, Johnsson C, Persson AEG. Effects of increased intra-abdominal pressure and volume expansion on renal function in the rat. *Nephrol Dial Transplant* 2003; 18:2269-2277.
- 29- Meier C, Contaldo C, Schramm R, Holstein JH, Hamacher J, Amon M, et. al. A new model for the study of the abdominal compartment syndrome in rats. *J Surg Res* 2007; 139(2):209-216.
- 30- Unsal MA, Suleyman G, Imamoglu M, Aydin S, Alver A. The effect of CO₂ insufflation-desufflation attacks on tissue oxidative stress markers during laparoscopy: a rat model. *Fertil Steril* 2009; 92(1):363-8.
- 31- Eleftheriadis E, Kotzampassi K, Papanotas K, Heliadis N, Sarris K. Gut ischemia, oxidative stress, and bacterial translocation in elevated abdominal pressuer in rats. *Word J Surg* 1996; 20:11-16.
- 32- Caldwell CB, Ricotta JJ. Changes in visceral blood flow with elevated intraabdominal pressure. *J Surg Res* 1987; 43:14-20.
- 33- Prabhu A, Sujatha DJ, Benjamin N, Vijayalakshmi MA. Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin as a Biomarker for Acute Kidney Injury in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting with Cardiopulmonary Bypass. *Ann Vasc Surg* 2010; 24:525-531.
- 34- Shevock PN, Khan SR, Hackett RL. Urinary chemistry of the normal Sprague-Dawley rat. *Urol Res* 1993; 21:309-312.



8- ANEXOS

Certificado da Comissão de Ética na experimentação animal



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal CEEA/Unicamp

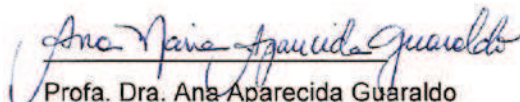
CERTIFICADO

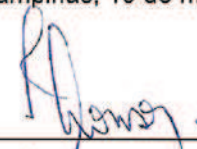
Certificamos que o Protocolo nº 1541-1, sobre "Avaliação imuno-histoquímica do grau de lesão renal aguda provocada por pneumoperitoneo cirúrgico em modelo experimental de ratos jovens e adultos", sob a responsabilidade de Prof. Dr. Joaquim M. Bustorff-Silva / Rogério Fortunato de Barros, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 19 de maio de 2008.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1541-1, entitled "Immune-hystochemical evaluation of acute renal injury in a surgical pneumoperitoneum model of young and adult rats", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on May 19, 2008.

Campinas, 19 de maio de 2008.


Profa. Dra. Ana Aparecida Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEEA – Unicamp
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
<http://www.b.unicamp.br/ceea/>

Kidney safety during surgical pneumoperitoneum: an experimental study in rats

Rogério Fortunato de Barros · Márcio Lopes Miranda ·
Amílcar Castro de Mattos · José Antonio Rocha Gontijo ·
Vinicius Rodrigues Silva · Brayner Iorio · Joaquim M. Bustorff-Silva

Received: 25 January 2012 / Accepted: 24 April 2012
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

Abstract

Background Elevations of intraabdominal pressure during laparoscopic procedures may lead to oliguria or anuria in mammals. Despite this, previous research has not been able to confirm an associated kidney injury. This study aimed to investigate the occurrence of an early kidney lesion secondary to surgical pneumoperitoneum in a rat model using the expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (N-GAL) as a biomarker for early kidney injury.

Methods In this study, 20 male Sprague-Dawley rats under general anesthesia and mechanically ventilated were allocated to one of five experimental time-dependent groups: group 1 (1-h control), group 2 (1-h pneumoperitoneum), group 3 (2-h control), group 4 (2-h pneumoperitoneum), and group 5 (positive kidney injury group induced by intravenous administration of cisplatin 7.5 mg/kg). To evaluate the renal expression of N-GAL 24 h after the procedure, all the rats underwent a 2-h urine output evaluation as well as laparotomy and bilateral nephrectomy performed sequentially to investigate the presence of renal injury using immunofluorescence qualification and western blotting.

Results Urine output was reduced and N-GAL expression was increased in the animals from the cisplatin group. The animals undergoing 1- or 2-h pneumoperitoneum displayed urine output and N-GAL expression similar to that of the animals from the matching control groups.

Conclusions Under the experimental conditions of this study, the animals with normal preoperative renal function did not show any type of acute kidney injury associated with the presence of a stabilized surgical pneumoperitoneum.

Keywords N-GAL · Rats · Renal injury · Surgical pneumoperitoneum

Laparoscopy currently is a recognized surgical approach that has greatly benefited patients, significantly reducing operative time and morbidity and resulting in a better postoperative recovery.

However, a few physiologic complications are closely associated with gas insufflation under pressure in the abdominal cavity of mammals [1–8]. Sudden and erratic elevations of intraabdominal pressure (IAP) can lead to a variety of adverse events during laparoscopic abdominal surgical procedures such as decreased venous return, subcutaneous emphysema, impaired ventilation, risk of gas embolism, and even abdominal compartment syndrome [9], especially in small mammals [7, 8].

Oliguria during pneumoperitoneum has been observed in numerous experimental studies, demonstrating a significant and reversible decrease in renal blood flow, urinary output, and glomerular filtration rate during the insufflations [1–8]. Findings have shown these effects to be pressure dependent. In the literature, decreased renal blood flow from vascular compression, ureteral obstruction, and systemic hormonal effects or direct renal compression are hypothesized to be possible causes of oliguria [10].

R. F. de Barros · M. L. Miranda · B. Iorio ·
J. M. Bustorff-Silva (✉)
Division of Pediatric Surgery, University of Campinas,
Campinas, SP, Brazil
e-mail: bustorff@hc.unicamp.br

A. C. de Mattos
Department of Pathology, University of Campinas, Campinas,
SP, Brazil

J. A. R. Gontijo · V. R. Silva
Laboratório de Metabolismo Hidro-Salino, Núcleo de Medicina
e Cirurgia Experimental, University of Campinas, Campinas, SP,
Brazil

Published online: 19 May 2012

 Springer

McDougall et al. [7] reported a decrease in creatinine clearance after 2 h of insufflation in an experimental model using pigs undergoing a 15-mmHg pneumoperitoneum. Kirsh et al. [5] found similar results in a 1-, 2-, and 4-h rat model of pneumoperitoneum set at 10 mmHg. Using a mean systemic arterial pressure of approximately 80 mmHg in rats as a reference, a 10-mmHg pneumoperitoneum in small rodents corresponds to an insufflation pressure of 15 mmHg in humans, whose systemic arterial pressure is about 100 to 120 mmHg [7].

In 2005, Dammier et al. [10], demonstrated significant oliguria during pneumoperitoneum in humans, mainly in patients younger than 2 years. These data, together with the increase in the number and complexity of laparoscopic operations in children, some with pre-damaged kidneys, have raised the issue whether laparoscopic procedures might cause any subclinical injury to the kidney cells?

This study aimed to investigate the occurrence of early kidney injury secondary to surgical pneumoperitoneum in a rat model using the urine output and the expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (N-GAL) as a biomarker for early kidney injury.

Materials and methods

In this study, 20 young male Sprague-Dawley rats about 80 days old and weighing 180–250 g were randomly allocated to one of five experimental groups: group 1 (1-h control), group 2 (1-h pneumoperitoneum), group 3 (2-h control), group 4 (2-h pneumoperitoneum), and group 5 (positive kidney injury induced by intravenously administered cisplatin 7.5 mg/kg to test the biomarker). This study was in agreement with the Ethical Principles for Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was authorized by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA/UNICAMP, certificate #1541-1).

The animals were confined under standardized laboratory conditions comprising a temperature of 20–24 °C, a relative humidity of 50 and 60 %, controlled light (day-night cycle of 12 h: 8/20 h), a standard diet for rodents, and filtered and chlorinated water.

Surgical procedure and urine collection

All the animals (fasted 6 h) were anesthetized with a combination of intraperitoneal ketamine 75 mg/kg and xylazine 5 mg/kg. A tracheotomy using a 16-Fr Abocath was performed, and the rats were mechanically ventilated with oxygen at 4 l/min using a piston-type rodent ventilator (Harvard Apparatus Model 687). The volume and frequency used in the ventilation followed the tidal volume

versus the weight and rate for laboratory mammals in the resting state ventilator graph in the ventilator revision.

A carbon dioxide (CO₂) pneumoperitoneum then was started through a no. 16 Abocath placed in the left lower abdominal quadrant using a DyoPneumatic15lt insufflator (Dyonics) set at 10 mmHg. The IAP was recorded through a separate intraabdominal catheter using a standard pressure monitor (Bese, Biomonitor7).

The IAP was kept stable using the valve system described previously [11]. In short, a mediastinal drainage bottle, connected through a three-way stopcock to the insufflation system, was interposed between the insufflator and the rat. This bottle was filled with sufficient water to create a water column the length of the desired IAP level. In this way, every time the system pressure exceeded the level of the water column, CO₂ escaped through the valve, avoiding sudden, undesired increments of IAP (Fig. 1).

A phlebotomy in the femoral artery with a 22-Abocath was used to measure oxygen saturation during the procedures. The animals from the cisplatin group received no tracheotomy, phlebotomy, or abdominal puncture. A 7.5-mg/kg cisplatin dose was administrated intravenously to induce acute kidney injury in four rats.

At the end of the surgery, the femoral artery was tied, and the rat trachea was closed with a 6.0 polypropylene U stitch. Postoperatively, all the rats were fed the standard diet for the species and filtered and chlorinated water ad libitum. The next morning, a 2-h urine sample was collected from the rats in a metabolic cage.

The rats were killed 24 h after the first procedure with intraperitoneal ketamine/xylazine, and a left nephrectomy was performed. A small part (1/8th) of this kidney was separated for western blotting. Right nephrectomy was performed after a 2-h intracardiac infusion of paraformaldehyde, and the resected kidney was kept in paraformaldehyde 2 % as preparation for posterior immunofluorescence.

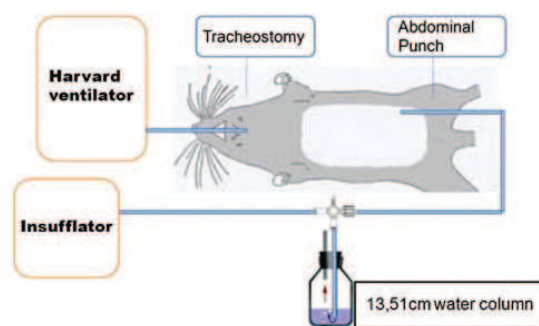


Fig. 1 Experimental setting comprising a valve system implemented with a three-way connector in a bottle of water with a 13.51-cm water column, which is similar to a 10-mmHg column (1 cm H₂O = 0.74 mmHg)

Western blotting analysis

After the left nephrectomy, one eighth of the kidney was minced coarsely and homogenized immediately in 10 vol of solubilization buffer (10 ml/l Triton-X 100, 100 mmol/l Tris (hydroxymethyl) amino-methane (Tris) pH 7.4, 10 mmol/l sodium pyrophosphate, 100 mmol/l sodium fluoride, 10 mmol/l ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 10 mmol/l sodium vanadate, 2 mmol phenylmethylsulfonyl fluoride (PSMF), and 0.1 mg/ml aprotinin at 4 °C using a polytron PTA 20S generator (model PT 10/35; Brinkmann Instruments, Westbury, NY, USA). The tissue extracts were centrifuged at 11,000 rpm at 4 °C for 40 min, and the supernatants were used as a sample.

Protein quantification was performed using the enzyme-linked immunoassay (ELISA) method. For quantification, both tissue and total extract samples (250 mg protein) were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). After electrophoretic separation, proteins were transferred to nitrocellulose membranes and then blotted with a specific antibody. The samples were treated with Laemmli buffer containing 100 of mmol/l dithiothreitol (DTT), heated in a boiling water bath for 4 min and subjected to 8 % SDS-PAGE in a Bio-Rad minigel apparatus (Mini-Protean; Bio-Rad).

Electro transfer of proteins from the gel to the nitrocellulose membranes was performed for 90 min at 120 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus (Mini-Protean). The nonspecific protein binding to the nitrocellulose was reduced by preincubating the filter for 2 h at 22 °C in a blocking buffer (5 % nonfat dry milk, 10 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, and 0.02 % Tween 20). The nitrocellulose blots were incubated at 4 °C overnight with primary N-GAL diluted at a ratio of 1:500 in a blocking buffer (3 % nonfat dry milk, 10 mmol/l Tris, 150 mmol/l NaCl, and 0.02 % Tween 20). Immunoreactive bands were detected using the enhanced chemiluminescence method (RPN 2108 ECL western blotting analysis system; Amersham Biosciences) and by autoradiography using preflashed Kodak XAR film (Eastman Kodak, Rochester, NY, USA) with a Cronex Lightning Plus intensifying screen (DuPont, Wilmington, DE, USA) for 60 min. Images of the developed autoradiography were scanned (Epson Stylus 3500), and band intensities were quantified by optical densitometry (Un-Scan-It gel, version 6.1) of the developed autoradiography used at exposures in the linear range.

Immunofluorescence analysis

The animals were perfused by a cardiac punch with saline containing heparin (5 %) for 15 min under constant pressure. This procedure was followed by perfusion with

0.1 mmol/l of phosphate buffer (pH 7.4) containing 4 % (w/v) paraformaldehyde and 0.1 mol/l (M) sucrose for 60 min.

After perfusion, the right kidney was removed and weighed, and representative samples were fixed in 4 % phosphate-buffered formalin during 24 h for paraffin embedding. The paraffin blocks were cut into 5- μ m-thick sections and stained with Sirius Red for evaluation of interstitial and perivascular fibrosis.

For immunohistochemical analysis, N-GAL antibody was used. The expressions of these proteins were immunohistochemically detected using the avidin-biotin-peroxidase method. Briefly, deparaffinized 5- μ m-thick kidney sections on poly-L-lysine-coated slides were treated with 29 % H₂O₂ in phosphate-buffered saline for 15 min, nonfat milk for 60 min, primary antibodies for 60 min, and avidin-biotin-peroxidase solution (Vector Laboratories Inc., CA, USA, 1:1:50 dilution). Antigen retrieval was performed using 0.01 mmol of citrate buffer (pH 6.0) boiling in a microwave oven (1,300 W) twice for 5 min each. Chromogen color was accomplished with 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) as the substrate to demonstrate the sites of peroxidase binding. The slides were counterstained with Harris's hematoxylin. No immunoreactivity was seen in the control experiments, during which one of the primary antibodies was omitted.

Statistical analysis

The data for each pneumoperitoneum and control group were compared using analysis of variance (ANOVA) and Turkey's test when necessary. The cisplatin group was used as a positive control group.

Results

The results are depicted in Figs. 2, 3, 4, and 5. Analysis of the data shows the following:

- (1) The 2-h urine output measured the morning after the procedure was similar in all the experimental and control groups except for the animals of the cisplatin group, which showed a significant decrease in urine output (Fig. 2).
- (2) Qualitative immunofluorescence analysis of N-GAL expression demonstrated intense tubular and glomerular lesions in the animals of the cisplatin group. Although signs denoting focal lesions and injuries of diffuse pattern were demonstrated in the animals of the experimental groups, these did not differ from those observed in the animals of the matching control groups (Figs. 4, 5).

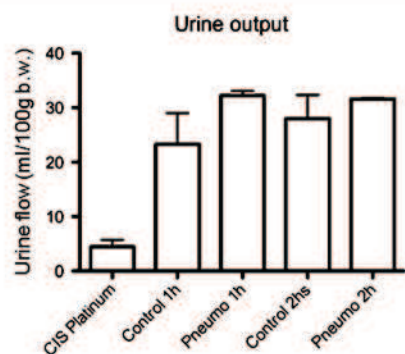


Fig. 2 Urine output during 2 h the morning after the first procedure, as determined by analysis of variance (ANOVA)

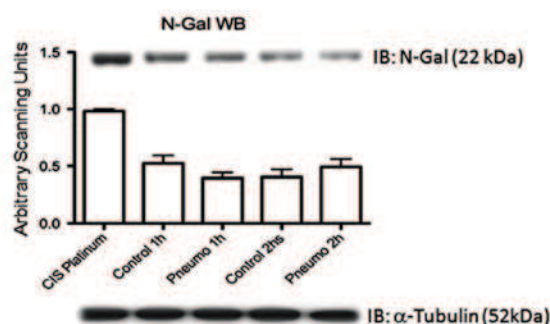


Fig. 3 Representative western blotting results comparing the percentage of kidney injury between the pneumoperitoneum and control groups. The cisplatin group was set as a 100 % injury. The control and pneumoperitoneum groups did not differ statistically according to analysis of variance (ANOVA)

- (3) Confirming these findings, quantitative analysis of N-GAL expression using western blotting showed a significant increase among the animals of the cisplatin

group. However, this increase in protein expression was not observed in the animals of the experimental groups, which displayed levels of N-GAL expression similar to those of the matching control groups (Fig. 3).

Discussion

Despite their unquestionable advantages over open surgery, laparoscopic operations are not free of complications, and the side effects of increased abdominal pressure secondary to the surgical pneumoperitoneum have been a source of concern for those involved with this technology. Reports of severe oliguria after laparoscopic surgery have been cited in the literature [5, 7, 10, 12, 13], possibly due to compression of the renal parenchyma, renal vein, and ureter, together with the decrease in cardiac output and the increased release of hormones from the renin-angiotensin-aldosterone system.

Lindstrom et al. [12] demonstrated a deterioration of the glomerular filtration rate by 70 % when IAP was maintained at 10 mmHg in rats. Concerning the cardiorespiratory system, reports show that increasing the intraabdominal CO₂ pressure may lead to respiratory acidosis and bradycardia, probably secondary to increased absorption and elevated blood content of CO₂ [14]. Also it has been demonstrated that increased IAP downregulates the cardiac output, leading to a reduction in the splanchnic arterial blood flow and visceral ischemia, which is more severe in the intestine [15–18]. Attempts at introducing a 4-h pneumoperitoneum group resulted in the death of three rats, probably due to accumulated acidosis.

The expansion of minimally invasive techniques in small infants and newborns has highlighted the need for more refined studies on the pathophysiology of surgical pneumoperitoneum. In the special case of neonatal laparoscopic surgery, maintaining a safe and reliable level of

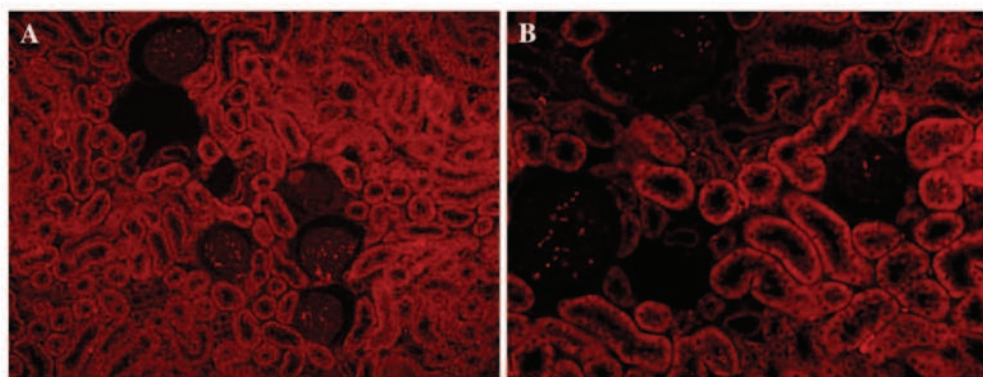


Fig. 4 Immunofluorescence staining analysis in a cisplatin group of rats showing tubular and glomerular lesions with a high presence of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (N-GAL). **A** $\times 20$ augmentation. **B** $\times 40$ augmentation

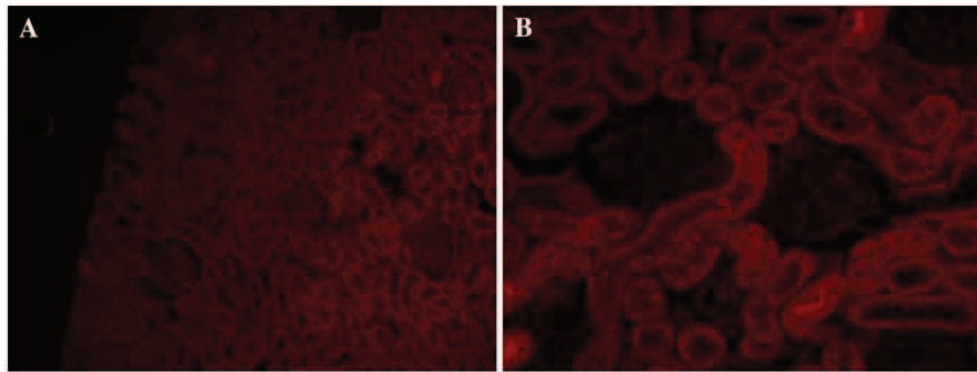


Fig. 5 Immunofluorescence analysis with low activity of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (N-GAL) in a 2-h control group and a 2-h pneumoperitoneum-induced group of rats. **A** $\times 20$ augmentation in a 2-h control group. **B** $\times 40$ augmentation in a 2-h pneumoperitoneum group

IAP appears to be a critical factor in reducing perioperative complications and increasing surgical safety [19–23].

Recent studies have shown not only that elevated levels of IAP generate systemic repercussions but also that the inadvertent repetition of abdominal cavity insufflation and disinflation with CO₂ may lead to a significant increase in the production of oxygen-free radicals that cause tissue injury [18]. In our study, we used the valve system to keep the IAP stable and secure within a safe range during the procedure. It is questionable whether this may have had a protective effect, preventing the development of kidney injury in this model. Further studies with and without this mechanism must be performed to investigate this effect. Notably, before the introduction of the valve system, most of the rats did not survive the peritoneal insufflation using the insufflators described.

Serum creatinine levels are not reliable for evaluating initial kidney injury because they vary widely with age, gender, lean muscle mass, muscle metabolism, and hydration status. Also, blood levels may not change until about 50 % of kidney function has already been lost [24]. Acute kidney injury represents a devastating problem in clinical medicine, and recovery depends on the early institution of treatment maneuvers, preferably before the serum creatinine level begins to rise.

Acute renal failure secondary to ischemic or nephron toxicity injury remains a common and potentially devastating problem in medical practice. Significant progress has been made in understanding the biochemical and molecular mechanisms of acute kidney injury, and several biomarkers have been developed that may be detected early in serum and urinary raised levels [25–30].

Biomarkers for early detection of acute kidney injury were developed in the past 10 years. A small-secreted polypeptide that is protease resistant may be readily detected in blood and urine with protein expression of

several promising biomarkers [25–30]. Urinary kidney injury molecule-1 (KIM-1), N-GAL, cysteine-rich protein 61, clusterin, interleukin-18, and F-actin are some of the promising molecules reported in the literature [18]. The status N-GAL as a predictive noninvasive biomarker has been studied. It has a post-ischemic expression, beginning within 3 h, and a maximum increased expression in the following 12–24 h [25].

As a 25-kDa protein belonging to the lipocalin family, N-GAL represents a novel, sensitive, noninvasive biomarker for renal ischemia. It is possible that upregulation of N-GAL in renal tubule cells may be induced by local release of cytokines from neutrophils trapped in the microcirculation early after ischemic injury [25, 26]. The lipocalin N-GAL may have predicted early kidney injury 2 h after cardiac surgery in several studies [31], and it certainly helps in postoperative care after complex surgeries.

Our data confirm kidney injury only in the animals from the cisplatin group (included as a positive control for kidney injury), both by N-GAL (immunofluorescence and western blotting) and by the low urine output and the results. The rats that underwent 1- or 2-h pneumoperitoneum did not show any statistical differences in the expression of N-GAL or in urine output compared with the matched control subjects. Although immunofluorescence showed changes in the experimental groups ranging from focal lesions to injuries in a diffuse pattern, these did not differ from those observed in the control groups and may represent an artifact resulting from the operation itself or from the method of conserving the kidneys for later study.

Conclusion

Under the experimental conditions of this study, in animals with normal preoperative renal function, we were not able

to detect any type of acute kidney injury associated with the presence of a stabilized surgical pneumoperitoneum. Further studies may be necessary to investigate the physiologic effects of pneumoperitoneum in animals with pre-existing renal conditions.

Disclosure Rogério Fortunato de Barros, Márcio Lopes Miranda, Amílcar Castro de Mattos, José Antonio Rocha Gontijo, Vinicius Rodrigues Silva, Brayner Iorio, and Joaquim M. Bustorff-Silva have no conflicts of interest or financial ties to disclose.

References

- Wellwood J, Sculpher MJ, Stoker S, Nicholls GJ, Geddes C, Whitehead A et al (1998) Randomised controlled trial of laparoscopic versus open mesh repair for inguinal hernia: outcome and cost. *BMJ* 317:103–110
- Hedican SP (2000) Laparoscopy in urology. *Surg Clin North Am* 80:1465–1485
- Dunn MD, McDougall EM (2000) Renal physiology: laparoscopic considerations. *Urol Clin North Am* 27:609–614
- Paparella A, Noviello C, Romano M, Parmeggiani P, Paciello O, Papparella S (2007) Local and systemic impact of pneumoperitoneum on prepubertal rats. *Pediatr Surg Int* 23:453–457
- Kirsh AJ, Hensle TW, Chang DT, Kayton ML, Olsson CA, Sawczuk IS (1994) Renal effects of CO₂ insufflation: oliguria and acute renal dysfunction in a rat pneumoperitoneum model. *Urology* 43:453–459
- Chang DT, Kirsh AJ, Sawczuk IS (1994) Oliguria during laparoscopic surgery. *J Endourol* 8:349–352
- McDougall EM, Monk TG, Wolf JS, Hicks M, Clayman RV, Stephanic G et al (1996) The effect of prolonged pneumoperitoneum on renal function in an animal model. *J Am Coll Surg* 182:317–328
- Chiu AW, Chang LS, Birkett DH, Babayan RK (1995) The impact of pneumoperitoneum, pneumoretroperitoneum, and gasless laparoscopy on the systemic and renal hemodynamic. *J Am Coll Surg* 181:397–406
- Bergstrom M, Swain P, Park P-O (2007) Measurements of intraperitoneal pressure and the development of a feedback control valve for regulating pressure during flexible transgastric surgery. *Gastrointest Endosc* 66:174–178
- Gomez Dammier BH, Karanik E, Gluer S, Jesch NK, Kubler J, Latta J et al (2005) Anuria during pneumoperitoneum in infants and children: a prospective study. *J Pediatr Surg* 40:1454–1458
- Iorio B, de Barros RF, Miranda ML, de Oliveira-Filho AG, Bustorff-Silva JM (2012) Evaluation of a simple valve mechanism used to stabilize intraabdominal pressure during surgically induced pneumoperitoneum in small animals. *Surg Endosc* 26:528–553
- Lindstrom P, Wadstrom J, Ollerstam A, Johnsson C, Persson AEG (2003) Effects of increased intraabdominal pressure and volume expansion on renal function in the rat. *Nephrol Dial Transplant* 18:2269–2277
- Nishio S, Takeda H, Yokoyama M (1999) Changes in urinary output during laparoscopic adrenalectomy. *BJU Int* 83:944–994
- Berguer R, Cornelius T, Dalton M (1997) The optimum pneumoperitoneum pressure for laparoscopic surgery in the rat model: a detailed cardiorespiratory study. *Surg Endosc* 11:915–918
- Meier C, Contaldo C, Schramm R, Holstein JH, Hamacher J, Amon M et al (2007) A new model for the study of the abdominal compartment syndrome in rats. *J Surg Res* 139:209–216
- Caldwell CB, Ricotta JJ (1987) Changes in visceral blood flow with elevated intraabdominal pressure. *J Surg Res* 43:14–20
- Eleftheriadis E, Kotzampassi K, Papanotas K, Heliadis N, Sarris K (1996) Gut ischemia, oxidative stress, and bacterial translocation in elevated abdominal pressure in rats. *World J Surg* 20:11–16
- Unsal MA, Suleyman G, Imamoglu M, Aydin S, Alver A (2009) The effect of CO₂ insufflation-desufflation attacks on tissue oxidative stress markers during laparoscopy: a rat model. *Fertil Steril* 92:363–368
- Ure BM, Jesch NK, Gluer S (2002) What's new in minimally invasive pediatric surgery? *Eur J Pediatr Surg* 12:361–365
- Rothenberg SS, Chang JH, Bealer JF (1998) Experience with minimally invasive surgery in infants. *Am J Surg* 176:654–658
- Georgeson KE, Robertson DJ (2004) Minimally invasive surgery in the neonate: review of current evidence. *Semin Perinatol* 28:212–220
- Georgeson K (2003) Minimally invasive surgery in neonates. *Semin Neonatol* 8:243–248
- Ure BM, Suempelmann R, Metzelder MM, Kuebler J (2007) Physiological responses to endoscopic surgery in children. *Semin Pediatr Surg* 16:217–223
- Bellomo R, Kellum JA, Ronco C (2004) Defining acute renal failure: physiological principles. *Intensive Care Med* 30:33–37
- Derajavan P, Mishra J, Barash J, Yang T, Zahedi K, Mitsnefes M et al (2003) Identification of neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a novel early urinary biomarker for ischemic renal injury. *J Am Soc Nephrol* 14:2534–2543
- Derajavan P (2007) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: new paths for an old shuttle. *Cancer Ther* 5(B):463–470
- Vaidya V, Ramirez V, Ichimura T, Bobadilla NA, Bonventre JV (2006) Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am J Physiol Renal* 290:517–529
- Ichino M, Kuroyanagi Y, Kusaka M, Mori T, Ishikawa K, Shiroki R et al (2009) Increased urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin levels in a rat model of upper urinary tract infection. *J Urol* 181:2326–2331
- Mishra J, Dent C, Tarabishi R, Mitsnefes MM, Ma Q, Kelly C et al (2005) Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. *Lancet* 365:1231
- Mitsnefes MM, Kathman TS, Mishra J, Kartal J, Khoury PR, Nickolas TL et al (2007) Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in children with chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol* 22:101
- Prabhu A, Sujatha DJ, Benjamin N, Vijayalakshmi MA (2010) Neutrophil gelatinase associated lipocalin as a biomarker for acute kidney injury in patients undergoing coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass. *Ann Vasc Surg* 24:525–531



Evaluation of a simple valve mechanism used to stabilize intraabdominal pressure during surgically induced pneumoperitoneum in small animals

Brayner Iorio · Rogerio F. de Barros ·
Márcio L. Miranda · Antônio Gonçalves de Oliveira-Filho ·
Joaquim M. Bustorff-Silva

Received: 6 May 2011 / Accepted: 6 August 2011 / Published online: 23 September 2011
© Springer Science+Business Media, LLC 2011

Abstract

Background Preventing sudden changes in intraabdominal pressure (IAP) during surgical pneumoperitoneum may reduce adverse events. This study aimed to describe a valve system that stabilizes intraabdominal pressure, minimizing complications of erratic fluctuations in IAP.

Methods Five male Sprague-Dowley rats were submitted to pneumoperitoneum, with the insufflator set sequentially at 5, 10, and 15 mmHg for each rat. Measures of IAP were taken initially without the valve and then using the same insufflator levels with the valve system regulated to three different pressures (5, 10, and 15 mmHg). The mean of the three highest registered pressures during a 15-min observation was used as the maximal pressure, and the mean of the three lowest registered pressures was used as the minimal pressure for each experimental setting.

Results Without the valve system, the pressure level set by the insufflator correlated poorly with the actual IAP. When the valve system was used, the IAP pressure was limited by the valve settings regardless of the insufflator settings. Also, the variability of IAP was significantly higher when no valve was used than in all situations that had implementation of the system.

Conclusions The valve system was very effective in stabilizing IAP, allowing a reproducible and reliable estimate of IAP and greatly reducing the variability resulting from the cycling mechanism of the insufflator. Due to the small dimensions of intracorporeal cavities in the newborn,

this mechanism may help to improve safety when neonatal video-assisted surgery is performed.

Keywords Intraabdominal pressure · Laparoscopy · Pneumoperitoneum · Rats

Laparoscopy is a surgical approach established and disseminated worldwide that has brought great benefits for both patients and surgeons, significantly reducing the operative time and morbidity while facilitating postoperative recovery. Although its feasibility and safety for infants and children have been repeatedly demonstrated in recent years [1–8], the physiologic changes associated with gas insufflation under pressure into the abdominal cavity are yet to be fully understood [9–19].

Sudden and erratic elevations of intraabdominal pressure (IAP) can lead to a variety of adverse events during laparoscopic procedures such as decreased venous return, impaired ventilation, gas embolism, subcutaneous emphysema, and even abdominal compartment syndrome [15, 17, 19–22], especially in newborns [23, 24]. Because of these risks, laparoscopic insufflators have been developed that allow the intraperitoneal pressure to be preset and controlled by using feedback pressure regulation. Nevertheless, Bergstrom et al. [25] noted the need to stabilize erratic elevations of IAP during endoscopic procedures. Additionally, preliminary observations in our laboratory (unpublished results) showed that in small animals, the pressure indicated by the insufflators does not always correspond to the intraabdominal pressure, with IAP peaks reaching up to three times the level indicated by the equipment.

The expansion of minimally invasive techniques to include small infants and newborns has shown the need for more refined studies on the pathophysiology of surgical

B. Iorio · R. F. de Barros · M. L. Miranda ·
A. G. de Oliveira-Filho · J. M. Bustorff-Silva (✉)
Department of Surgery, State University of Campinas
Medical School, Rua Alexander Fleming, 181,
Campinas, SP 13083-887, Brazil
e-mail: bustorff@hc.unicamp.br

pneumoperitoneum, particularly in infants. To be able to evaluate the physiologic impact of pneumoperitoneum properly and prevent intraoperative complications associated with increased IAP, it is crucial that the IAP be maintained stable at known values during the whole procedure.

This report describes a valve system that aims to stabilize intraabdominal pressure during surgical pneumoperitoneum, allowing adequate estimation of IAP and minimizing complications from erratic IAP fluctuations.

Animals and methods

Animals

This experiment was in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was authorized by the Ethics Committee on Animal Use (CEUA/UNICAMP, certificate no. 2054). Our laboratory follows the Guidelines for the Design and Statistical Analysis of Experiments Using Laboratory Animals [26]. Five male Sprague-Dawley rats about 80 days old and weighing 200–250 g with good general appearance and no evidence of active disease at inspection were used in this experiment. The animals were confined under standardized laboratory conditions, namely, temperatures 20–24°C, relative humidity 50–60%, controlled light (day/night cycle of 12 h:8 h/20 h), a standard diet for the species, and filtered and chlorinated water.

Experimental protocol

After a 2-day period of adaptation, the animals were anesthetized with intraperitoneal ketamine 75 mg/kg and xylazine 5 mg/kg. A tracheostomy was performed, and the rats were mechanically ventilated at a fixed tidal volume and respiratory rate with room air using a piston-type rodent ventilator (Harvard Apparatus Model 687, Harvard Apparatus, Dover, MA).

Next, a carbon dioxide (CO₂) pneumoperitoneum was started with a DyoPneumatic15lt insufflator (Dyonics, Smith & Nephew, Andover, MA) set sequentially at 5, 10, and 15 mmHg for each rat. The insufflator pressure levels were changed at 15-min intervals, and IAP was recorded through a separate intraabdominal catheter using a standard pressure monitor (Bese, Biomonitor7, Bese - Bio Engenharia de Sistema e Equipamentos S.A., Belo Horizonte, MG, Brazil). The maximal pressure during the 15-min observation period was defined as the mean of the three highest registered pressures, and the mean of the three lowest registered pressures was used as the minimal pressure for each experimental setting. Differential pressure

was defined as the difference between the maximal and minimal pressures for each setting.

After this initial evaluation, a valve system consisting of a mediastinal drainage bottle connected through a three-way stopcock to the insufflation system was interposed between the insufflator and the rat. This bottle then was filled with enough water to create a water column the length of the desired IAP level, as depicted in Fig. 1. This way, every time the system pressure exceeded the level of the water column, CO₂ was allowed to escape through the valve, avoiding sudden, undesired increments of IAP. Pressures were measured as described earlier, with the water column set at 5, 10, and 15 mmHg (6.8, 13.6, and 20.4 cm of H₂O, respectively) for each insufflator pressure.

Statistical analysis

The data for each configuration of valve and insufflator are expressed as the mean $\pm$ standard deviation for the five animals. Each animal served as its own control, and the IAP recorded without the valve was compared with the IAPs observed using the valve system set at three different values (5, 10 and 15 mmHg). Two-way repeated measures analysis of variance (ANOVA) and Bonferroni post hoc testing were used to analyze the results. Comparison among the differential pressures was done using one-way ANOVA followed by Dunn's test when deemed necessary. Statistical significance was set at an α value of 0.05. The minimum number of animals required to complete the study was calculated using G*Power 3 software, version 3.1.2 (available at <http://www.psych.uni-duesseldorf.de/abteilungen/aap/gpower3/>) based on an α error probability of 0.05 and an effect size of $D = 5.9$. Using these

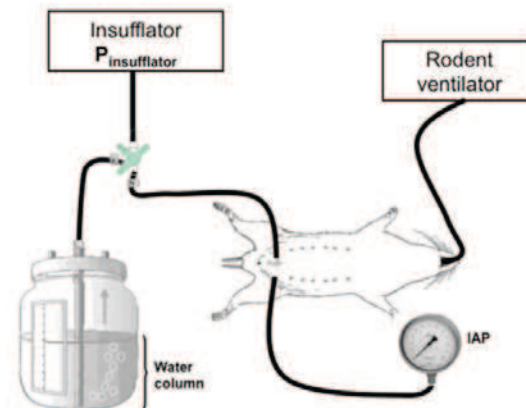


Fig. 1 Diagram of the valve system. In order to use the valve, the three-way stopcock has to be set open in the three directions, allowing CO₂ to escape through the mediastinal drainage bottle whenever the IAP exceeds the length of the preset water column

parameters, the calculated minimal number of the five animals for a two-sided test yielded a power exceeding 99% ($1 - \beta$ error probability).

Results

For all five animals, the use of the valve resulted in a substantive decrease in both the intraabdominal and the differential pressure levels. Without the valve system, the pressure level set by the insufflator and the actual IAP correlated poorly, with the latter reaching four times the level set in the insufflator. When the valve system was used, the IAP pressure was limited by the valve settings regardless of the insufflator settings (Table 1; Figs. 2, 3). Also, the variability of IAP, measured by the difference between the maximal and minimal pressures, was significantly higher when there was no valve than in all other situations that had implementation of the system ($P < 0.05$, Figs. 4, 5).

Discussion

The data from this experiment show that during the performance of pneumoperitoneum in this small animal model, the insufflator pressure did not correspond to the IAP, and peaks of pressure occurred that exceeded the values recorded by the insufflator as much as threefold. Another observation was that probably due to the cycling mechanism of the insufflator, the IAP varied very acutely from below 10 mmHg to values higher than 25 mmHg, a

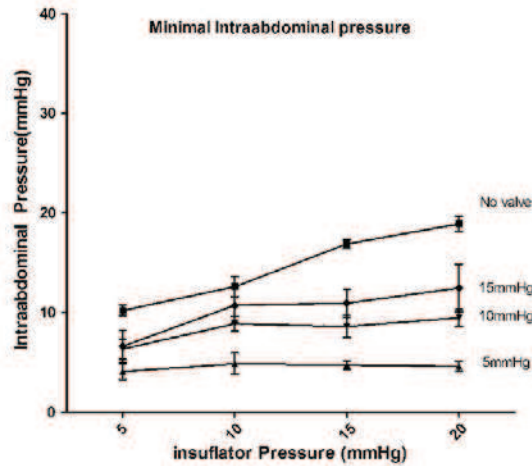


Fig. 2 Graphical representation of the minimal intra-abdominal pressure observed in the different insufflator pressure levels with or without the use of the valve system

variation of almost 300% in a very short period. Use of the described valve system resulted in a predictable intraabdominal pressure that was more stable, showing only minor variations during the cycling of the insufflator, whose maximal levels were limited by the pressure set by the size of the water column in the valve.

Despite its unquestioned advantages over open surgery, laparoscopic operations are not free of complications, and the side effects of increased abdominal pressure secondary to the surgical pneumoperitoneum have been a source of

Table 1 Mean intraabdominal pressure (IAP) observed for the different experimental settings

Insufflator	Valve (mmHg)	IAP minimum (mmHg)	IAP maximum (mmHg)	Differential pressure (mmHg)
5 mmHg	No valve	18.93 ± 2.96	33.67 ± 4.06	12.7 ± 4.81
	5	4.07 ± 0.80	6.87 ± 1.55	2.8 ± 1.08
	10	6.33 ± 0.98	8.80 ± 1.26	2.47 ± 0.92
	15	6.60 ± 1.64	12.27 ± 1.16	5.67 ± 0.98
10 mmHg	No valve	12.60 ± 4.05	24.40 ± 1.51	11.8 ± 2.91
	5	4.87 ± 1.06	7.33 ± 0.98	2.47 ± 0.52
	10	8.87 ± 0.74	11.27 ± 0.80	2.4 ± 0.63
	15	10.73 ± 1.75	13.67 ± 1.54	2.93 ± 1.03
15 mmHg	No valve	16.87 ± 1.77	30.53 ± 3.25	13.7 ± 2.16
	5	4.73 ± 0.46	7.07 ± 0.70	2.33 ± 0.49
	10	8.60 ± 1.12	10.93 ± 1.16	2.33 ± 0.49
	15	10.93 ± 1.44	13.67 ± 1.50	2.73 ± 0.88
20 mmHg	No valve	21.13 ± 3.91	31.53 ± 8.33	11.8 ± 5.2
	5	4.60 ± 0.51	7.13 ± 0.83	2.53 ± 0.74
	10	9.47 ± 0.83	11.80 ± 0.68	2.33 ± 0.72
	15	12.47 ± 2.39	15.07 ± 1.79	2.6 ± 0.91

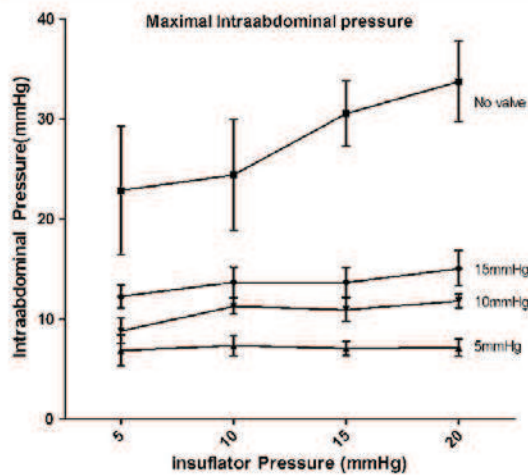


Fig. 3 Graphical representation of the maximal intra-abdominal pressure observed in the different insufflator pressure levels with or without the use of the valve system

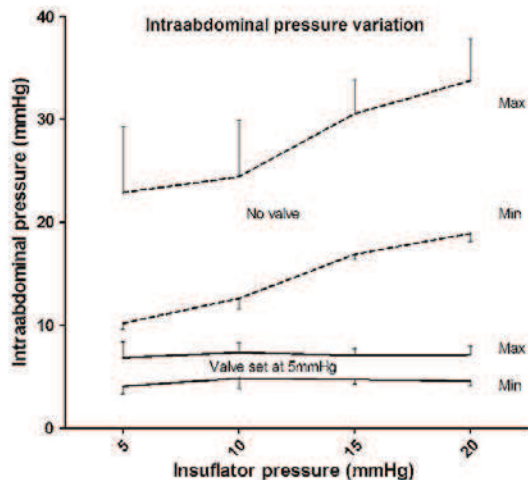


Fig. 4 Graphical representation of the variation in intra-abdominal pressure observed for a valve adjustment of 5 mmHg ($P < 0.0001$, two-way ANOVA)

concern for those involved with this technology. Reports of severe oliguria after laparoscopic surgery have appeared in the literature [15, 17, 27]. The oliguria has been associated with compression of the renal parenchyma, renal vein, and ureter, together with a decrease in cardiac output and increased release of hormones of the renin-angiotensin-aldosterone system and antidiuretic hormone (ADH). Lindstrom et al. [15] demonstrated deterioration of the glomerular filtration rate by 70% when IAP was maintained at

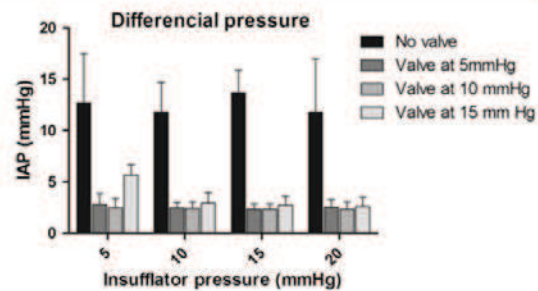


Fig. 5 Graphical representation of the differential (maximal minus minimal) intra-abdominal pressure observed at the different valve settings using different insufflator pressures

10 mmHg in rats. Concerning the cardiorespiratory aspect, reports have shown that increasing the intraabdominal CO_2 pressure may lead to respiratory acidosis and bradycardia, probably secondary to increased absorption and elevated blood content of CO_2 [20]. Findings also have demonstrated that increased IAP and consequent reduction in cardiac output may significantly reduce splanchnic arterial blood flow, promoting visceral ischemia, which is more severe in the intestine [21, 22].

Recent studies have shown that not only elevated levels of IAP generate systemic repercussions. The findings show that the inadvertent repetition of the process of abdominal cavity inflation and deflation with CO_2 also may lead to a significant increase in the production of oxygen-free radicals that ultimately cause tissue injury [19]. This makes it important to maintain the IAP stable and secure within a safe range during the laparoscopic procedure, a goal accomplished by the aforementioned system.

In the special case of neonatal laparoscopic surgery, maintaining a safe and reliable level of IAP appears to be a critical factor in reducing perioperative complications and increasing surgical safety [23, 24]. The data from this report show that especially in the management of small cavities, the pressure indicated in the insufflator monitor may not correspond with the actual IAP, and it is believed that this may lead to poor control over the physiologic side effects of neonatal laparoscopy. Further studies using this type of system should be performed to evaluate its role in preventing the occurrence of undesirable side effects from surgical pneumoperitoneum.

In conclusion, the simple valve system described in this report was very effective in stabilizing IAP in the small animals, allowing a reproducible and reliable estimate of the IAP and greatly reducing the variability resulting from the cycling mechanism of the insufflator. Due to the small dimensions of intracorporeal cavities in the newborn, it is believed that this mechanism may have a role in improving safety when neonatal video-assisted surgery is performed.

Acknowledgments The first author Brayner Dulfes Luis Marques Iorio is the recipient of a Brazilian governmental funding agency grant FAPESP 2010/01085-1.

Disclosures Brayner Iorio, Rogerio F. de Barros, Márcio L. Miranda, Antônio Gonçalves de Oliveira-Filho, and Joaquim M. Bustorff-Silva have no conflicts of interest or financial ties to disclose.

References

- Bax NM (2005) Laparoscopic surgery in infants and children. *Eur J Pediatr Surg* 15:319–324
- Fujimoto T, Segawa O, Lane GJ, Esaki S, Miyano T (1999) Laparoscopic surgery in newborn infants. *Surg Endosc* 13: 773–777
- Georgeson K (2003) Minimally invasive surgery in neonates. *Semin Neonatol* 8:243–248
- Kuebler JF, Ure BM (2011) Minimally invasive surgery in the neonate. *Semin Fetal Neonatal Med* 16:151–156
- Ure BM, Jesch NK, Gluer S (2002) What's new in minimally invasive paediatric surgery? *Eur J Pediatr Surg* 12:361–365
- Van Niekerk ML, Visser A, Venter DJ (2005) Laparoscopic antireflux surgery in infants and children. *S Afr Med J* 95:675–677
- Waldschmidt J, Schier F (1991) Laparoscopic surgery in neonates and infants. *Eur J Pediatr Surg* 1:145–150
- Rothenberg SS, Chang JH, Bealer JF (1998) Experience with minimally invasive surgery in infants. *Am J Surg* 176:654–658
- Georgeson KE, Robertson DJ (2004) Minimally invasive surgery in the neonate: review of current evidence. *Semin Perinatol* 28:212–220
- Gueugniaud PY, Abisseror M, Moussa M, Godard J, Foussat C, Petit P, Dodat H (1998) The hemodynamic effects of pneumoperitoneum during laparoscopic surgery in healthy infants: assessment by continuous esophageal aortic blood flow echo-Doppler. *Anesth Analg* 86:290–293
- Guven S, Muci E, Unsal MA, Yulug E, Alver A, Duman MK, Mentese A (2010) The effects of carbon dioxide pneumoperitoneum on ovarian blood flow, oxidative stress markers, and morphology during laparoscopy: a rabbit model. *Fertil Steril* 93: 1327–1332
- Holland AJ, Ford WD (1998) The influence of laparoscopic surgery on perioperative heat loss in infants. *Pediatr Surg Int* 13:350–351
- Iwanaka T, Arai M, Ito M, Kawashima H, Imaizumi S (2000) Laparoscopic surgery in neonates and infants weighing less than 5 kg. *Pediatr Int* 42:608–612
- Iwanaka T, Uchida H, Kawashima H, Nishi A, Kudou S, Satake R (2004) Complications of laparoscopic surgery in neonates and small infants. *J Pediatr Surg* 39:1838–1841
- Lindstrom P, Wadstrom J, Ollerstam A, Johnsson C, Persson AE (2003) Effects of increased intra-abdominal pressure and volume expansion on renal function in the rat. *Nephrol Dial Transplant* 18:2269–2277
- Mulholland TL, Kropp BP, Wong C (2005) Laparoscopic renal surgery in infants 10 kg or less. *J Endourol* 19:397–400
- Nishio S, Takeda H, Yokoyama M (1999) Changes in urinary output during laparoscopic adrenalectomy. *BJU Int* 83:944–947
- Truchon R (2004) Anaesthetic considerations for laparoscopic surgery in neonates and infants: a practical review. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 18:343–355
- Unsal MA, Guven S, Imamoglu M, Aydin S, Alver A (2009) The effect of CO₂ insufflation–desufflation attacks on tissue oxidative stress markers during laparoscopy: a rat model. *Fertil Steril* 92: 363–368
- Berguer R, Cornelius T, Dalton M (1997) The optimum pneumoperitoneum pressure for laparoscopic surgery in the rat model: a detailed cardiorespiratory study. *Surg Endosc* 11:915–918
- Eleftheriadis E, Kotzampassi K, Papanotas K, Heliadis N, Sarris K (1996) Gut ischemia, oxidative stress, and bacterial translocation in elevated abdominal pressure in rats. *World J Surg* 20: 11–16
- Meier C, Contaldo C, Schramm R, Holstein JH, Hamacher J, Amon M, Wanner G, Trentz O, Menger MD (2007) A new model for the study of the abdominal compartment syndrome in rats. *J Surg Res* 139:209–216
- Ure BM, Sumpelmann R, Metzelder MM, Kuebler J (2007) Physiological responses to endoscopic surgery in children. *Semin Pediatr Surg* 16:217–223
- Sumpelmann R, Schuerholz T, Marx G, Jesch NK, Osthaus WA, Ure BM (2006) Hemodynamic changes during acute elevation of intra-abdominal pressure in rabbits. *Paediatr Anaesth* 16:1262–1267
- Bergstrom M, Swain P, Park PO (2007) Measurements of intra-peritoneal pressure and the development of a feedback control valve for regulating pressure during flexible transgastric surgery (NOTES). *Gastrointest Endosc* 66:174–178
- Festing MF, Altman DG (2002) Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *ILAR J* 43:244–258
- Chang DT, Kirsch AJ, Sawczuk IS (1994) Oliguria during laparoscopic surgery. *J Endourol* 8:349–352

Relação dos animais de experimentação utilizados com idade, peso,
volume de urina e resultado das leituras de *western blotting*

	peso	idade	urina	padrao	leitura
Rato 1 cisplatina	430	90	3,4	0,298 0,362 0,385	0,077 0,067 0,069
Rato 2 cisplatina	406	90	2,3	0,298 0,362 0,385	0,81 0,72 0,71
Rato 3 cisplatina	413	123	6,8	0,298 0,362 0,385	0,081 0,072 0,072
Rato 4 cisplatina	422	122	2,5	0,298 0,362 0,385	0,081 0,072 0,071
Rato 5 G-2H Controle	231	57	10,5	0,249 0,255 0,255	0,127 0,101 0,099
Rato 6 G-2H Controle	202	41	15,4	0,218 0,194 0,190	0,036 0,043 0,041
Rato 7 G-2H Controle	250	88	16	0,105 0,119 0,137	0,048 0,064 0,039
Rato 8 G+2H Estudo	242	90	15,3	0,124 0,127 0,135	0,046 0,038 0,061

	peso	idade	urina	padrao	leitura
Rato 9 G-2H Controle	310	54	12	0,170 0,172 0,210	0,052 0,069 0,068
Rato 10 G+2H Estudo	296	75	19	0,186 0,187 0,199	0,029 0,047 0,052
Rato 11 G+2H Estudo	294	75	18,5	0,186 0,187 0,199	0,050 0,035 0,044
Rato 12 G+2H Estudo	294	70	16	0,173 0,171 0,169	0,045 0,046 0,049
Rato 13 G-1H Controle	314	70	7	0,156 0,173 0,209	0,063 0,065 0,064
Rato 14 G-1H Controle	340	70	15	0,156 0,173 0,209	0,070 0,067 0,070
Rato 15 G-1h Controle	300	68	23,3	0,173 0,174 0,224	0,054 0,047 0,064
Rato 16 G-1h Controle	307	68	13	0,173 0,174 0,224	0,043 0,037 0,054
Rato 17 G+1H Estudo	384	77	23,2	0,253 0,244 0,255	0,086 0,063 0,089
Rato 18 G+1H Estudo	262	50	16,8	0,207 0,202 0,202	0,070 0,047 0,056
Rato 19 G+1H Estudo	239	50	16,4	0,207 0,202 0,202	0,111 0,065 0,056
Rato 20 G+1H Estudo	230	50	8	0,207 0,202 0,202	0,046 0,048 0,041

FLUXOGRAMA MATERIAIS E MÉTODOS

