

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Vanessa Milech

**ESTRESSE OXIDATIVO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM
CADELAS SUBMETIDAS À PNEUMOPERITÔNIO AQUECIDO OU
NÃO EM OVARIOHISTERECTOMIAS**

Santa Maria, RS
2018

PPGMV/UFSM, RS

MILECH, Vanessa

Mestre

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

Vanessa Milech

**ESTRESSE OXIDATIVO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM
CADELAS SUBMETIDAS À PNEUMOPERITÔNIO AQUECIDO OU
NÃO EM OVARIOHISTERECTOMIAS**

Santa Maria, RS
2018

Vanessa Milech

**ESTRESSE OXIDATIVO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CADELAS
SUBMETIDAS À PNEUMOPERITÔNIO AQUECIDO OU NÃO EM
OVARIOHISTERECTOMIAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação
em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica
Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial
para obtenção do Grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Maurício Veloso Brun

Santa Maria, RS, Brasil
2018

Milech, Vanessa

ESTRESSE OXIDATIVO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CADELAS
SUBMETIDAS À PNEUMOPERITÔNIO AQUECIDO OU NÃO EM
OVARIOHISTERECTOMIAS / Vanessa Milech.- 2018.
50 p.; 30 cm

Orientador: Maurício Veloso Brun
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós
Graduação em Medicina Veterinária, RS, 2018

1. Cirurgia Laparoscópica 2. Estresse oxidativo 3.
Histologia peritoneal I. Veloso Brun, Maurício II. Título.

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Departamento de Clínica de Pequenos Animais**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado

**ESTRESSE OXIDATIVO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM
CADELAS SUBMETIDAS À PNEUMOPERITÔNIO AQUECIDO OU
NÃO EM OVARIOHISTERECTOMIAS**

elaborada por
Vanessa Milech

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão examinadora:

**Maurício Veloso Brun, Prof. Dr. (UFSM) - Videoconferência
(Presidente/Orientador)**

Daniel Curvello de Mendonça Müller, Prof. Dr. (UFSM)

Anelise Bonilla Trindade, Prof. Dr. (UFRGS)

Santa Maria, 09 de fevereiro de 2018.

AGRADECIMENTOS

À Deus, obrigada por sempre me acompanhar nessa trajetória, pela força e por ser meu guia.

A minha família, meus amados pais Velma e Gilberto, pela inspiração, por acreditarem em mim, pelo porto seguro, por estarem sempre perto. As minhas irmãs, cunhados e aos mais lindos sobrinhos que eu poderia ter. Agradeço todos os dias por ter vocês na minha vida, eu amo nossa família, o que somos, e o que construímos, vocês são a base de tudo, e foram os protagonistas nesta caminhada que foi o mestrado.

Ao meu amado namorado Bruno, aquele que sem dúvida foi o mais presente em todos os momentos. Desconheço outro alguém que possa levar a melhor definição de companheiro como tu. Obrigada por ter sido meu amigo, por ter cuidado de mim quando tantas vezes estive triste longe de casa, por me incentivar e me dar alguns “puxões de orelha”. São muitas coisas a agradecer, mas só posso dizer que eu tenho muita sorte de ter uma pessoa tão especial e inteligente ao meu lado.

Ao meu orientador, professor Mauricio Veloso Brun, um excelente profissional e exemplo de dedicação, agradeço imensamente pela oportunidade do mestrado, por acreditar no meu trabalho, por poder acompanhar e aprender sobre videocirurgia, espero continuar esta parceria.

Ao grupo SOMIV, Vanessa, Michelli, Gabriela, Marcella, João, Hellen, Felipe, Mairi, Bernardo, Rammy, Etiene, Carol, Roberta, Stephanie e Maurício. Obrigada pela companhia durante a rotina, nas aulas e nos projetos.

Aos laboratórios Lacvet e BIOOX, especialmente a professora Cinthia, e as alunas de doutorado Juliana e Thais. Vocês foram fundamentais na realização deste projeto. Obrigada pela paciência e dedicação que tiveram, e por me permitir aprender com profissionais exemplares.

A professora Glaucia pela colaboração, paciência e empenho neste projeto através da avaliação histológica.

Ao professor Marco Augusto, por toda a colaboração e dedicação que teve a este projeto, principalmente com a parte estatística.

A Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária pela oportunidade, excelente estrutura e aprendizado transmitido aos discentes.

Agradeço a todos os tutores que permitiram a participação das pacientes neste projeto. Ao mesmo tempo em que a sociedade auxilia a construção do conhecimento, a academia tenta retornar serviços com excelência.

A todos os animais que tive o prazer de chamar de pacientes, e também a um felino em especial chamado Tramadol, que mesmo longe de mim no mestrado, sempre foi o meu amorzinho.

RESUMO

ESTRESSE OXIDATIVO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA EM CADELAS SUBMETIDAS À PNEUMOPERITÔNIO AQUECIDO OU NÃO EM OVARIOHISTERECTOMIAS

AUTOR: VANESSA MILECH

ORIENTADOR: MAURÍCIO VELOSO BRUN

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 09 de fevereiro de 2018.

O presente estudo buscou avaliar a influência do gás carbônico (CO₂) aquecido ou não, sobre os biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo no sangue e tecido peritoneal, bem como a histologia peritoneal, em cadelas submetidas a ovariohisterectomia videoassistida. Utilizou-se uma amostra de 20 fêmeas caninas distribuídas em dois grupos, sendo as pacientes do grupo aquecido (GAQ) (n=10) submetidas ao pneumoperitônio com CO₂ aquecido a 37°C, e as do grupo não aquecido (GNA) (n=10) submetidas ao CO₂ frio. Os tempos de coleta para avaliação de inflamação e estresse oxidativo no sangue e tecido, corresponderam a (T0) antes da insuflação da cavidade, (T1) após 30 minutos de pneumoperitônio, e (T3) 60 minutos de exposição ao CO₂. Foram avaliados os biomarcadores sanguíneos acetilcolinesterase (AChE), butirilcolinesterase (BChE), mieloperoxidase (MPO), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), espécies reativas de oxigênio (EROS), tióis totais (t-SH) e glutatona reduzida (GSH), e também os biomarcadores de estresse oxidativo no tecido peritoneal CAT, SOD e TBARS. Além disso, foi realizada a análise histológica do peritônio avaliando-se congestão, hemorragia, edema e presença de células inflamatórias. A AChE apresentou diferença entre grupos em T1 (p=0,0268) e T2 (p=0,0423), sendo maior no GAQ, enquanto a BChE variou entre os momentos, T0 e T2, do GAQ (p=0,0175). A atividade da CAT foi diferente no GAQ entre T0 e T1, e também T1 e T2 (p=0,0253), sendo maior no T1. Houve diminuição nos níveis de TBARS (p=0,0117) e GSH (p=0,0114), entre T0 e T2 do GNA. As análises SOD, MPO, t-SH e EROS não apresentaram diferença. Não foram observadas diferenças nos parâmetros histológicos avaliados. Avaliando-se a atividade da CAT no tecido, o GAQ apresentou diferença entre T1 e T2 (p=0,0150), e comparando-se os grupos em cada momento, houve aumento no T2 do GAQ (p=0,0288). Em relação a atividade da SOD no peritônio, no GAQ houve diferença entre T2 em relação ao T0 e T1 (p=0,0181). Avaliando-se os grupos em cada momento isoladamente, houve aumento apenas no T1 do GNA (p=0,0287). Na avaliação do TBARS tecidual, não houve diferença entre os momentos ou grupos avaliados. Os biomarcadores séricos, AChE e BChE, apresentaram maior atividade no GAQ, indicando maior inflamação, havendo também, um aumento momentâneo da CAT, indicando estresse oxidativo no GAQ. A utilização do CO₂ aquecido em comparação ao CO₂ não aquecido, não demonstrou mudanças na histologia peritoneal, entretanto, foi visto que o uso de gás aquecido demonstrou alteração em valores de marcadores de estresse oxidativo peritoneal (CAT e SOD), quando comparado ao grupo CO₂ não aquecido.

Palavras-chave: Cirurgia laparoscópica. Espécies reativas de oxigênio. Peritônio. Canino.

ABSTRACT

OXIDATIVE STRESS AND INFLAMMATORY RESPONSE IN BITCHES SUBMITTED TO PNEUMOPERITONEUM HEAT OR NOT HEAT IN OVARIOHYSTERECTOMIES

AUTHOR: Vanessa Milech

ADVISER: MAURÍCIO VELOSO BRUN

Date and Place of Defense: Santa Maria, February 09th, 2018

The present study aimed to evaluate the influence of carbon dioxide (CO₂) on inflammatory and oxidative stress biomarkers on serum and peritoneal tissue, moreover, peritoneal histology in bitches submitted to video-assisted ovariohysterectomy. A sample of 20 female canines distributed in two groups was used, where patients in the heated group (HCD) (n=10) were submitted to pneumoperitoneum with CO₂ heated at 37°C, and the unheated group (UCD) (n=10) subjected to cold CO₂. The sample times for evaluation of inflammation and oxidative stress in blood and tissue corresponded to (T0) before cavity insufflation, (T1) after 30 minutes of pneumoperitoneum, and (T3) 60 minutes of CO₂ exposure. We evaluated the serum biomarkers acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE), myeloperoxidase (MPO), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), reactive oxygen species (ROS), total thiols (t-SH) and reduced glutathione (GSH), as well as the biomarkers of oxidative stress CAT, SOD and TBARS in the peritoneal tissue. Additionally, histological analysis of the peritoneum was performed, evaluating congestion, hemorrhage, edema and the presence of inflammatory cells. AChE presented a difference between groups in T1 (p=0.0268) and T2 (p=0.0423), being higher in HCD, whereas BChE ranged between T0 and T2 of HCD (p=0.0175). The CAT activity was different in HCD between T0 and T1, and also T1 and T2 (p=0.0253), being higher in T1. There was a decrease in the levels of TBARS (p=0.0117) and GSH (p=0.0114), between T0 and T2 of UCD. The SOD, MPO, t-SH and EROS analyzes showed no difference. No differences were observed in the histological parameters evaluated. In CAT activity evaluation in tissue, the HCD presented a difference between T1 and T2 (p=0.0150), and comparing the groups, there was an increase in T2 of HCD (p=0.0288). In relation to SOD activity in the peritoneum, HCD was different on T2 in relation to T0 and T1 (p=0.0181), and in groups comparison, there was increase only in T1 of UCD (p=0, 0287). In the assessment of peritoneal TBARS, there was no difference between the moments or groups evaluated. Serum biomarkers, AChE and BChE, showed greater activity in HCD, indicating greater inflammation, and there was also a momentary increase in CAT, indicating oxidative stress in HCD. The use of warmed CO₂ compared to unheated CO₂ did not show changes in peritoneal histology, however, it was seen that the use of heated gas showed alterations in values of peritoneal oxidative stress markers (CAT and SOD) when compared to CO₂ group not heated.

Keywords: Laparoscopic surgery. Oxigen-reactive species. Peritoneum. Canine.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1

Figure 1. Serum inflammatory and oxidative stress biomarkers. (*) indicates significant difference ($p < 0.05$) between the groups and between time periods. T0: assessment before CO₂ insufflation, immediately after the onset of the surgical procedure; T1: after 30 minutes of exposure to CO₂, when pressure reached 10 mmHg; T2: 60 minutes after initial CO₂ insufflation. HCD= heated carbon dioxide, UCD= Unheated carbon..... 29

ARTIGO 2

Figura 2. (A) Posicionamento dos portais para a técnica de ovariectomia videoassistida nos animais experimentais. (B) Momento da biópsia peritoneal para histologia peritoneal e avaliação do estresse oxidativo no T0. Note que a mão do cirurgião apoia externamente a parede muscular para coleta. (C) Amostras de tecido peritoneal após biópsia. (D) Biópsia peritoneal para histologia peritoneal no T1, e avaliação estresse oxidativo no T1 e T2..... 45

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 2

Tabela 1. Médias (\pm DP) da avaliação histológica do peritônio em cadelas submetidas à pneumoperitônio com CO ₂ aquecido ou não, nos momento basal (T0), aos 30 minutos (T1) e 60 minutos (T2) de exposição ao CO ₂	45
Tabela 2. Médias (\pm DP) da análise peritoneal de CAT, SOD e TBARS em cadelas submetidas à pneumoperitônio com CO ₂ aquecido ou não, no momento basal (T0), aos 30 minutos (T1) e 60 minutos de exposição ao CO ₂ (T2).....	46

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. ARTIGO 1.....	14
2.1. ABSTRACT.....	16
2.2. BACKGROUND	17
2.3. METHODS	18
2.4. RESULTS	21
2.5. DISCUSSION	21
2.6. CONCLUSIONS.....	25
2.7. REFERENCES.....	25
3. ARTIGO 2.....	30
3.1. RESUMO.....	32
3.2. INTRODUÇÃO	33
3.3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.3.1. Seleção de pacientes	34
3.3.2. Procedimento anestésico	34
3.3.3. Procedimento cirúrgico.....	35
3.3.4. Análise histológica	35
3.3.5. Análise de estresse oxidativo	36
3.3.6. Estatística	37
3.4. RESULTADOS	37
3.5. DISCUSSÃO	38
3.6. CONCLUSÕES	41
3.7. REFERÊNCIAS.....	42
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
5. REFERÊNCIAS	48

1. INTRODUÇÃO

A ovariectomia (OVH) é o procedimento cirúrgico mais realizado na casuística veterinária de pequenos animais, sendo indicada para esterilização eletiva, no tratamento de afecções do trato reprodutivo (FERREIRA et al., 2011; MALM et al., 2005), e ainda na estabilização de doenças sistêmicas, como nos casos de epilepsia e diabetes melito (HEDLUND, 2008). Além disso, pode diminuir o risco de desenvolvimento de neoplasias mamárias e de piometra (DAVIDSON et al., 2004). Para realização da técnica cirúrgica de OVH descreve-se desde a abordagem convencional via celiotomia mediana (DAVIDSON et al., 2004), até as abordagens minimamente invasivas videocirúrgicas, incluindo a cirurgia laparoscópica, a técnica laparoscópica híbrida (videoassistida), por único acesso cutâneo (LESS) ou por orifícios naturais (NOTES) (SILVA et al., 2015; BASSO et al., 2012).

A cirurgia laparoscópica tem se tornado uma das principais abordagens minimamente invasivas, e apresenta vantagens quando comparada as cirurgias convencionais. Entre essas, podemos citar menor desconforto e dor pós-operatórios, reduzido período de hospitalização pós-operatória, menor risco de deiscência e hemorragia, redução na formação de aderências e menor trauma tecidual, além de melhores resultados estéticos (DUQUE & MORENO, 2015; FERREIRA et al., 2011; MALM et al., 2005).

Para exposição e manipulação dos órgãos intra-abdominais durante a laparoscopia, é necessário que seja realizada a insuflação intraperitoneal por um gás, para criar o pneumoperitônio (DUQUE & MORENO, 2015). O dióxido de carbono (CO₂) é o gás de escolha nas cirurgias videolaparoscópicas, pois embora irritante ao peritônio, não é um gás inflamável, é inerte, dissolve-se rapidamente na corrente sanguínea (devido a elevada solubilidade), é estável, não tóxico em quantidades fisiológicas e pode ser absorvido pelo tecido e removido pelo sistema respiratório, além de ser produto do metabolismo (DUQUE & MORENO, 2015; TARHAN et al., 2013).

O CO₂ padrão utilizado atualmente na prática laparoscópica em humanos, é frio e seco (20-21°C e 0,0002% de umidade relativa), não sendo fisiológico para a condição normal da cavidade peritoneal - 36°C e 100% de umidade relativa (YU et al., 2013). Conforme Balayssac et al. (2016), a difusão do gás na cavidade abdominal pode ser responsável por lesões e desidratação peritoneais. Em alguns casos, o CO₂ não afeta apenas a estrutura do peritônio, mas também a sua fisiologia, apresentando hipóxia e acidose que provocam apoptose das células

mesoteliais. A apoptose leva a áreas peritoneais desnudas que facilitam a formação de aderências (TARHAN et al., 2013). Além disso, de acordo com Herrmann & Wilde (2015), o resfriamento da cavidade ainda pode levar a hipotermia transoperatória, aumento do tempo de recuperação pós-operatória e complicações como dor pós-operatória. Objetivando limitar os efeitos adversos apresentados pelo uso do CO₂ frio e seco, técnicas de insuflação de gás aquecido e umidificado têm sido desenvolvidas (BALAYSSAC et al., 2016).

Estudos realizados por Peng et al. (2009), utilizando como modelo experimental ratos Wistar em diferentes grupos submetidos a insuflação com CO₂ frio e seco (21°C, <1% umidade relativa) e CO₂ quente e úmido (37°C, 98% umidade relativa), concluíram que a insuflação com o CO₂ aquecido e umidificado resulta significativamente em menor hipotermia, menor dano peritoneal e redução na formação de aderências, em comparação com CO₂ frio. Em contrapartida, estudos em humanos e leitões, realizados respectivamente por Balayssac et al. (2016) & Glew et al. (2004), não demonstraram alterações na superfície mesotelial em ambos os grupos, CO₂ aquecido e umidificado (37°C, 98-100%) e CO₂ frio e seco (19-20°C, 0%). Hazebroek et al. (2002), concluíram que alterações da superfície peritoneal podem ocorrer após a insuflação do CO₂, independentemente se o gás é aquecido ou umidificado.

Alterações estruturais na superfície peritoneal, danos celulares e resposta inflamatória são possíveis alterações que devem ser avaliadas na histologia (PENG et al., 2009; PAPPARELLA et al., 2014). Conforme Volz et al., (1999) e Hazebroek et al., (2002), a lesão peritoneal caracterizada pela exposição das células mesoteliais, além de facilitar a formação de aderências intra-abdominais, aumenta o risco de implementação de células tumorais e infecções. A lesão peritoneal grave, após insuflação prolongada com CO₂ frio e seco, pode aumentar o risco de metástases peritoneais. Ainda é desconhecido se o CO₂ quente e umidificado pode evitar tais intercorrências, embora tenha sido relatada a capacidade de reduzir o crescimento do tumor e disseminação na cavidade, após insuflações de curta duração (PENG et al., 2009).

A produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), é parte integrante do metabolismo e pode ser observada em diversas condições fisiológicas (VASCONCELOS et al., 2007). Em contrapartida, a produção excessiva de radicais pode conduzir ao estresse oxidativo, que provém de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes (BARBOSA et al., 2010). A formação de radicais livres é aumentada durante a cirurgia abdominal, como resultado de isquemia-reperfusão, ativação de leucócitos e disfunção mitocondrial. Acredita-se que a cirurgia laparoscópica em comparação a cirurgia convencional aberta, proporcione menor

formação de EROS e estresse oxidativo, por provocar menor dano tecidual e inflamação sistêmica, além de estar associada com a preservação da função imunológica (ARSALANI-ZADEH et al., 2011).

Existem evidências de que o pneumoperitônio, formado durante a laparoscopia, induz ao estresse oxidativo local e sistêmico, conforme mensurado através de marcadores de peroxidação de lipídeos. Recentemente foi proposto que, a resposta cirúrgica associada a esse estresse pode estar relacionada à exposição da cavidade peritoneal a um meio não fisiológico, ou seja, ar ambiente em cirurgias convencionais, e CO₂ frio e seco nas cirurgias laparoscópicas (SAMMOUR et al., 2011).

O estresse oxidativo pode ser quantificado por meio de diferentes biomarcadores, pela medição direta dos radicais livres, dos produtos finais de danos dos radicais livres, ou dos níveis de antioxidantes específicos e totais (ARSALANI-ZADEH et al., 2011). Estas medidas podem ser realizadas em tecidos, sangue e outros fluidos (FERREIRA et al., 1997). Os principais biomarcadores para o estudo dessa condição compreendem as enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione redutase e a glicose-6-fosfatodesidrogenase (FINKEL & HOLBROOK, 2000). Além destes, a peroxidação dos lipídeos é geralmente avaliada por medição das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), que analisa o malondialdeído (MDA) presente na amostra (BARBOSA et al., 2010).

As enzimas acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BchE) séricas, são utilizadas como indicadores da inflamação local ou sistêmica de baixo grau. A acetilcolina (ACh), tem uma importante ação supressora inflamatória, no entanto ela é rapidamente hidrolisada pela AChE e BchE. Portanto, um aumento nas atividades de AChE e BchE, poderiam levar a diminuição dos níveis de ACh, reduzindo os seus efeitos anti-inflamatórios (DAS, 2012).

A mieloperoxidase (MPO) tem sido sugerida como um dos novos parâmetros para avaliação precoce de certas condições patológicas, incluindo doenças não-infecciosas. É uma heme-proteína produzida por neutrófilos e macrófagos, sendo que sua principal função reside na defesa do organismo através da produção de ácido hipocloroso (HOCl), considerado um forte oxidante (VELLOSA et al., 2013; HOY et al., 2002).

Durante a revisão bibliográfica realizada, a respeito da utilização do CO₂ aquecido na insuflação da cavidade abdominal para formação do pneumoperitônio, foi observado uma

escassez de estudos que avaliam o uso do CO₂ aquecido em comparação com o CO₂ frio, tanto em modelos experimentais como em pacientes da rotina hospitalar. Embora a literatura apresente trabalhos com benefícios da utilização do CO₂ aquecido, poucos estudos *in vivo* fazem a comparação entre os efeitos do CO₂ frio e quente na histologia peritoneal, e um número ainda menor de trabalhos avaliam biomarcadores inflamatórios e de estresse oxidativo no tecido peritoneal e no sangue total. Associado a isso, conforme o conhecimento da autora, inexistem estudos considerando essas variáveis isoladamente em caninos submetidos à ovariectomia videoassistida.

O presente trabalho apresentou uma proposta inovadora envolvendo a realização das análises de estresse oxidativo, inflamação e histologia, observando a resposta tecidual e sistêmica ao uso do pneumoperitônio, aquecido ou não, em uma espécie distinta das trazidas na literatura para esse tipo de investigação. O rato é muito utilizado como modelo animal no estudo do pneumoperitônio, porém os estudos disponíveis consideram o pneumoperitônio avaliando temperaturas e umidade isoladamente, o que pode trazer resultados diferentes de uma situação onde o animal é submetido ao pneumoperitônio em diferentes temperaturas associado ao procedimento cirúrgico, como o sugerido por este projeto. Ainda assim, o modelo canino pode apresentar uma heterogeneidade considerável nos estudos, uma vez que existe uma grande variação individual e se desconhece quanto à natureza de sua resposta frente a essas variáveis.

Sendo assim, esta dissertação foi conduzida com o objetivo de determinar a ocorrência de lesões na histologia peritoneal, bem como avaliar a resposta inflamatória e o estresse oxidativo em cadelas submetidas ao pneumoperitônio com CO₂ aquecido ou não, durante a realização de ovariectomias videoassistidas.

2. ARTIGO 1

TRABALHO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO
Periódico: BMC Veterinary Research
(INSS 1746-6148)

**INFLAMMATORY AND OXIDATIVE STRESS BIOMARKERS IN
BITCHES SUBJECTED TO PNEUMOPERITONEUM ESTABLISHED
WITH EITHER HEATED OR UNHEATED CO₂ IN VIDEO-ASSISTED
OVARIOHYSTERECTOMIES**

Inflammatory and oxidative stress biomarkers in bitches subjected to pneumoperitoneum established with either heated or unheated CO₂ in video-assisted ovariohysterectomies

Vanessa Milech^{1*}, Maurício Veloso Brun²

¹ Postgraduate Program at Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil.

²Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil. Researcher of CNPq/Brazil (308019/2015-6; 200346/2017-2).

*Corresponding author: Vanessa Milech. Address: Avenida Roraima, 1000, 97195-000, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil, Tel.: +55 53 981486172, e-mail vanessamilech@gmail.com

2.1. Abstract

Background Laparoscopic surgery has become one of the main minimally invasive approaches, and currently the standard CO₂ used in laparoscopic practice in humans is cold and dry. The production of reactive oxygen species is an integral part of the metabolism and can be observed in several physiological conditions, however, it has been proposed that the surgical response associated with oxidative stress may be related to the exposure of the peritoneal cavity to a medium non-physiological. The aim of this study was to assess inflammatory and stress biomarkers in bitches subjected to video-assisted ovariohysterectomies in which pneumoperitoneum was achieved with insufflation of either heated or unheated CO₂. Two groups of 10 animals underwent surgery with pneumoperitoneum using unheated carbon dioxide (UCD) and heated carbon dioxide (37°C, HCD). Serum biomarkers acetylcholinesterase (AChE), butyrylcholinesterase (BChE), myeloperoxidase (MPO), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), reactive oxygen species (ROS), total thiols (t-SH), and reduced glutathione (GSH) were assessed prior to insufflation (T0), at 30 minutes (T1), and at 60 minutes (T2) after exposure to CO₂.

Results AChE differed between the groups at T1 (p=0.0268) and T2 (p=0.0423) and was higher in the HCD group, whereas BChE varied between T0 and T2 in the HCD group (p=0.0175). CAT activity differed in the HCD group between T0 and T1 and between T1 and T2 (p=0.0253), and was higher at T1. TBARS (p=0.0117) and GSH (p=0.0114) were lower between T0 and T2 in the HCD group. However, SOD, MPO, total thiols, and ROS did not show any difference.

Conclusions AChE and BChE presented the highest activity in the HCD group, indicating higher inflammation, in addition to a transient increase in CAT, indicating oxidative stress in the HCD group.

Keywords: Videosurgery - Heated gas – Inflammation - Reactive oxygen species.

2.2. Background

Laparoscopic surgery has become one of the major minimally invasive approaches and has some advantages over conventional surgery, causing less postoperative discomfort and pain, lower risk of wound dehiscence and hemorrhage, fewer adhesions, and less tissue injury [1]. Carbon dioxide (CO₂) is the gas of choice in videolaparoscopic surgeries [1]; however, according to Yu *et al.* [2], cold and dry CO₂ (20–21 °C with 0.0002% of relative humidity) is the golden standard currently used in laparoscopic procedures in humans, but it is not physiological for the normal condition of the peritoneal cavity (36 °C with 100% of relative humidity).

Reactive oxygen species (ROS) production is an integral part of the metabolism and can be found in several physiological conditions [3]. On the other hand, excessive production of free radicals could lead to oxidative stress, which results from an imbalance between oxidant and antioxidant compounds [4]. ROS production increases during abdominal surgery as a consequence of reperfusion injury, leukocyte activation, and mitochondrial dysfunction [5].

Laparoscopic surgery, when compared with conventional open surgery, is believed to produce fewer ROS and less oxidative stress as it causes less tissue injury and less systemic inflammation, in addition to preserving immunological function [5]. There is evidence that pneumoperitoneum, established during laparoscopy, leads to local and systemic oxidative stress, as indicated by lipid peroxidation markers [6].

Oxidative stress can be quantified by different biomarkers by direct measurement of free radicals, of end products of the damage caused by free radicals, or of specific and total antioxidant levels [5]. Among the main indicators of oxidative stress are antioxidant enzymes such as SOD, CAT, and glutathione (GPx), regarded as the first line of bodily defense against ROS production [7].

Lipid peroxidation is usually assessed by measurement of TBARS, which measures the presence of malondialdehyde (MDA) in the sample [4]. Serum AChE and BChE are used as markers of low-grade local or systemic inflammation [8], whereas MPO has been suggested as one of the new parameters for early evaluation of certain pathological conditions, including noninfectious diseases [9].

Sammour *et al.* [6] claimed that the surgical response associated with oxidative stress could be related to the exposure of the peritoneal cavity to a non-physiological medium, i.e., ambient air in conventional surgeries and cold and dry CO₂ in laparoscopic surgeries. Accordingly, the aim of this study was to assess inflammatory response and oxidative stress in bitches subjected to video-assisted ovariohysterectomies with pneumoperitoneum produced by insufflation of heated or unheated CO₂.

2.3.Methods

This study was conducted at the Teaching Veterinary Hospital of Universidade Federal de Santa Maria (HVU-UFSM) after approval by the local Committee on Animal Research and Ethics (CEUA), process no. 3883261216. Twenty mixed-breed adult female dogs aged up to 8 years, with mean body mass of 18.99 ± 3.87 kg, referred for elective ovariohysterectomy, were included in the study. All of the selected patients were considered to be healthy after going through a general clinical examination followed by laboratory tests (blood count, platelet count, and hepatic and renal serum biochemistry), in addition to abdominal ultrasound scan for assessment of the genital tract. The patients were admitted on the day of the surgical procedure after being fasted with no solid foods for 12 h and with no water for 6 h.

The animals were randomly assigned to two groups (10 females per group). One group was subjected to pneumoperitoneum with unheated CO₂ (UCD) and the other one to peritoneum with heated CO₂ (HCD), at 37 °C.

Preanesthetic medication (MPA) consisted of IM tramadol chlorhydrate (4 mg/kg) - (Tramadol chlorhydrate 100 mg/2mL[®], Teuto, Brazil). Fifteen minutes after MPA administration, hair was removed around the operative field and around the venous access site. After cephalic vein cannulation and onset of fluid therapy with lactated Ringer's solution at the rate of 10 mL/kg/hour (Lactated Ringer's solution, Sanobiol, Brazil), IV propofol (4 mg/kg) - (Diprivan1%[®], Cristália, Brazil) was used for anesthetic induction, and isoflurane (1CAM) - (Isoforine[®], Cristália, Brazil), vaporized in 100% oxygen, was used for anesthetic maintenance. Antibiotic chemoprophylaxis with IV cephalothin (30 mg/kg) - (Cephalothin sodium 1g[®], ABL, Brazil) was administered prior to the surgery. The temperature in the operating room was kept between 25 and 27 °C throughout the surgical procedure, and patient temperature was monitored.

Video-assisted ovariectomy was performed using two trocars. The first one (10 mm) was inserted in the umbilical scar region by the open technique, whereas the second one was placed in the prepubic region through the laparoscopic view, at a strategic point for exposure of the reproductive tract. A pressure of 10 mmHg and a constant rate of insufflation of 2 L/min were applied to the pneumoperitoneum. Surgical wounds were sutured in three planes using polyglactin 910 2-0 (Polyglactin 910 2-0, Shalon[®], Brazil) in Sultan pattern in the muscle layer, followed by the same suture pattern with 3-0 thread (Polyglactin 910 3-0, Shalon[®], Brazil) in the subcutaneous tissue, and Wolff pattern with monofilament 4-0 nylon suture for the skin (Nylon 4-0, Technofio[®], Brazil). Postoperative analgesia was achieved with meloxicam (0.1 mg/kg) - (Maxicam 0.2%[®], Ourofino, Brazil) and with the combined administration of sodium dypirone (25 mg/kg) and N-butylscopolamine (0.2 mg/kg) - (Buscofin Composto[®], Agener União, Brazil). The patients remained on these medications for 3 consecutive days, given at 24-hour and 8-hour intervals, respectively.

The levels of inflammation and oxidative stress were assessed by serum biomarkers. Blood samples were collected by jugular vein puncture (total volume of 5 mL of blood, placed in tubes with and without EDTA, and with citrate). Blood collection times were T0 – before CO₂ insufflation and immediately after the onset of the surgical procedure; T1 – 30 minutes after exposure to CO₂, recorded from the time the pressure reached 10 mmHg; and T2 – 60 minutes after the initial administration of CO₂.

SOD measurement followed Mccord and Fridovich [10], using 200 µL of total blood collected in citrate. MPO activity was determined in the plasma using 200 µL of total blood collected in EDTA, followed by the analysis described by Metcalf *et al.* [11].

TBARS levels were measured according to Jentzsch *et al.* [12], regarding MDA concentration as a lipid peroxidation product, using thiobarbituric acid (TBA) and 600 µL of serum. A 2'-7'-dichlorofluorescein assay was performed with 200 µL of serum to measure peroxide production at the cell level and other ROS [13]. AChE in total blood was measured by the method proposed by Ellman *et al.* [14], modified by Worek *et al.* [15], whereas serum BChE was determined by the method of Ellman *et al.* (1961), using 100 µL of total blood and 200 µL of serum, respectively. By using 200 µL of total blood, collected in citrate, CAT activity was measured by the method of Nelson and Kiesow [16]. The total number of thiol groups was analyzed by spectrophotometry following the method of Ellman [17]. Reduced glutathione (GSH) was measured by spectrophotometry using Ellman's reagent [17] and 400 µL of serum for each analysis.

The data were analyzed by the Shapiro-Wilk test to check for normality, followed by the independent t test for comparison between the groups in the same time period, and finally, by the repeated-measures two-way ANOVA for comparison of time periods in the same group, followed by Tukey's post-hoc test. The analyses were performed in GraphPad Prism 6.01, and differences were considered to be significant at $p \leq 0.05$.

2.4.Results

The results of the biomarkers can be found in Figure 1. Briefly, a higher AChE activity was observed in the HCD group at T1 ($p=0.0268$) and T2 ($p=0.0423$), whereas BChE revealed differences between T0 and T2 in the HCD group ($p=0.0175$), with no difference between the groups. This study sought to assess a possible inflammatory and oxidative stress response mediated by MPO, but no difference was detected between the groups or time periods.

No significant differences in SOD levels were observed between time periods and groups. Nevertheless, there was some significant difference in CAT activity between T0 and T1 and between T1 and T2 in the HCD group ($p=0.0253$). GSH activity was statistically significant only in the UCD group between T0 and T2 ($p=0.0114$). The ROS assessed herein showed no increase in the HCD and UCD groups in any time period. Thiol plasma concentrations did not differ significantly between the groups or between the time periods. TBARS levels were lower in the UCD group between T0 and T2 ($p=0.0117$).

2.5.Discussion

The study evaluated only healthy animals of a given breed and body weight, but the heterogeneity observed in the veterinary hospital routine is much larger than when laboratory animals are used, and this limitation of the study may bias the final results. In order to minimize possible factors that could increase this bias, all surgeries were carried out by the same surgeon, with all collections performed in the same period, and laboratory tests for oxidative stress and inflammatory markers were conducted on the same day.

Acetylcholine (ACh) has an important suppressive effect on inflammation, however, it is quickly hydrolyzed by AChE and BchE, therefore, an increase in the activity of these enzymes could predispose to a decrease in ACh levels, thereby reducing its anti-inflammatory effects [8]. The increase in AChE and BchE activity is likely related to exposure to HCD,

indicating improvement of inflammatory response in the HCD group when compared with the UCD group; however, there was no increase when T1 and T2 were compared with T0. This is in agreement with the study conducted by Sammour *et al.* [18], who found that heated and humidified CO₂ did not reduce the inflammatory response. Thus, inflammation in the HCD group is probably related to the fact that hypothermia has a reducing effect on tissue metabolism, where metabolic rate and O₂ consumption are largely influenced by temperature. The low demand of a cooled tissue for O₂, glucose, and other metabolites increases the survival of cells during ischemic events [19]. Moreover, previous studies showed that low temperatures reduce apoptosis, mitochondrial failure, and inflammation in cases of brain ischemia [20].

The major role of MPO, an enzyme found in the azurophilic granules of neutrophils, is bodily defense by production of hypochlorous acid [9]. Furthermore, it is implicated in the destruction of pathogens, inflammatory conditions, and oxidative stress [9]. The lack of difference in MPO between the groups may suggest that both AChE and BChE were more sensitive than in the early detection of a systemic infection.

SOD, CAT, and GPx are enzymes that make up the enzymatic antioxidant defense system. They act as prevention mechanisms, warding off and controlling the formation of ROS [4]. Widely distributed in the cell cytosol or in the mitochondrion, SOD catalyzes the conversion of superoxide to hydrogen peroxide, regarded as one the key reactions of the enzymatic antioxidant system against the superoxide radical [21]. CAT, alongside GPx, acts by not allowing hydrogen peroxide to accumulate, as this ROS, through Fenton and Haber-Weiss reactions, generates the hydroxyl radical, considered to be the most deleterious to cells and against which there is no enzymatic defense system [4].

The findings about SOD activity could indicate no production of superoxide and, therefore, its activity did not increase in any of the groups. However, CAT activity rose in the HCD group from baseline (T0) to the end of CO₂ insufflation. These data thus allow us to claim

there was oxidative stress, as CAT increases its activity to reduce hydrogen peroxide formation. To some extent, CAT activity is related to SOD, as enzymatic activity in oxidative events and in cell protection depends on the amount of hydrogen peroxide that reaches the mitochondrion, on how quick these radicals are generated, and on the antioxidant reserve [22], evidencing the secondary effect of CAT on the reduction of ROS production. The absence of changes in SOD activity may have contributed to hydrogen peroxide production from the superoxide radical.

The plasmatic membrane is permeable to hydrogen peroxide, but not to the superoxide radical; the diffusion of these compounds occurs through aquaporins and anion channels, respectively. Thus, it is believed that this, combined with a larger blood circulation in the tissue exposed to a higher temperature [23], could enhance the diffusion of hydrogen peroxide into the bloodstream, augmenting the plasmatic activity of CAT in the HCD.

As pointed out by Vasconcelos *et al.* [3], GSH plays crucial roles in the cells, especially as a cofactor for the GPx enzyme, protecting them against oxidative stress. Also, it is the only non-protein thiol found in aerobic species and its antioxidant intracellular role includes ROS detoxification. GSH results demonstrates the importance of a thorough analysis of oxidative stress biomarkers and indicates that the UCD group also produced ROS, but in lesser amounts, when compared with the HCD group. Nonetheless, these findings are at odds with those obtained for ROS production, which did not differ between the groups. This may be explained by the fact that, when ROS are assessed, there might be a wide range of ROS that could go undetected at some moment. However, when the end product of oxidative stress, or more specifically antioxidants, is evaluated, ROS production becomes evident.

ROS production is essential for maintenance of homeostasis, providing it occurs during the physiological process. ROS include a broad array of chemical species, such as superoxide anion, hydrogen peroxide, and the hydroxyl radical, which can be generated in an exogenous or endogenous fashion and from different sources [7]. Our results are consistent with the

findings of Rosenfeldt *et al.* [24], who claim that ROS concentrations are often low because they are quickly neutralized and eliminated by the antioxidant system, even if they are highly reactive to other molecules. Therefore, ROS activity is usually assessed indirectly by means of stable metabolites or by the end products derived from the interaction of these radicals with lipids, amino acids, or DNA.

Our thiol protein marker results indicate that ROS production was presumably attenuated by GSH in the UCD group, and the possible ROS production in the HCD was influenced by CAT. Thiols are compounds with the sulfhydryl group (-SH) bound to a carbon atom, and are considered endogenous molecules that help cells maintain a reducing state, even in an oxidative environment [25].

Total thiol measurements are used as parameter to determine the oxidative damage caused to plasma proteins [26]; hence, the products generated during oxidative stress end up inactivating protein function, reducing thiol levels in the plasma [27]. Therefore, there would be a reduction in thiol levels in the event of larger oxidation, not only of proteins, but also of lipids. Moran *et al.* [27] claim that proteins that have access to the thiol group are in quite a reducing environment, being protected or buffered against oxidation. Hence, only proteins with accessible thiol groups participate in signaling mechanisms.

TBARS dose aldehydes, which are secondary metabolites of lipid oxidation, and MDA is the most abundant aldehyde and major marker of lipid peroxidation [3, 4,]. This decrease in lipid peroxidation could be associated with ischemia triggered by a lower temperature-dependent metabolism of tissues exposed to unheated gas. Under hypothermal conditions, the amount of free radical production is significantly reduced, but it is not totally hindered [20].

The lack of differences between HCD and UCD groups is similar to what Sammour *et al.* [6] found in their study, i.e., no significant difference in TBARS levels; however, note that

they compared the use of heated and humidified CO₂ with cold and dry CO₂. Baysal *et al.* [28] assessed biomarkers while pneumoperitoneum was maintained, moment at which it reduces perfusion and ischemia; nonetheless, the largest ROS production occurs at the beginning of reperfusion [29]. These biomarkers should be assessed after a short reperfusion period in order to check whether different temperatures of the gas used to establish pneumoperitoneum during the procedure could change ROS production in this critical period by modulation through temperature in the cell metabolism during the ischemic episode. These analyses should also be performed in the peritoneal tissue in order to detect possible local changes and to correlate them with plasmatic alterations.

2.6. Conclusions

With regard to serum markers of oxidative stress and inflammation, AChE and BChE showed higher activity in the HCD than in the UCD group, indicating larger inflammation, with a transient increase in CAT, which could indicate oxidative stress in the HCD group. Therefore, the use of heated pneumoperitoneum in the target population of the present study revealed poorer results than with the use of unheated gas, for the parameters evaluated.

2.7. References

1. Duque CTN, Moreno JCD. Anestesia e analgesia para videolaparoscopia. In: Brun, M. V. Videocirurgia em pequenos animais. 1^o ed. Rio de Janeiro: Editora Roca, 2015. Cap. 2, p. 7- 20.
2. Yu TC, Hamill JK, Liley A, Hill AG. Warm, humidified carbon dioxide gas insufflation for laparoscopic appendectomy in children: a double-blinded randomized controlled trial. *Annals of Surgery*, 2013; 257(1):44-53.
3. Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Benfato VM, Benfato MS, Kubota L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano

- oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, 2007; 30:1323-1338.
4. Barbosa KBF, Costa NMB, Alfenas RCG, Paula SO, Minim VPR, Bressan J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. *Revista de Nutrição*, 2010; 23:629-643.
 5. Arsalani-Zadeh R, Ullah S, Khan S, Macfie J. Oxidative stress in laparoscopic versus open abdominal surgery: a systematic review. *Journal of Surgical Research*, 2011; 169(1): 59-68.
 6. Sammour T, Mittal A, Delahunt B, Phillips ARJ, Hill AG. Warming and humidification have no effect on oxidative stress during pneumoperitoneum in rats. *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies*, 2011; 20(6):329-337.
 7. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 2000; 408(6809):239-247.
 8. Das UN. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as possible markers of low-grade systemic inflammation. *Medical Science Monitor*, 2007; 13(12):214-221.
 9. Hoy A, Leininger-Muller B, Kutter D, Siest G, Visvikis S. Growing significance of myeloperoxidase in non-infectious diseases. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 2002; 40(1):2-8.
 10. Mccord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, 1969; 244(22):6049-6055.
 11. Metcalf JA, Gallin JJ, Nauseef WM, Root RK. *Laboratory Manual of Neutrophil Function*. Raven Press: New York, 1986.
 12. Jentsch AM, Bachmann H, Furst P, Biesalski HK. Improved analysis of malondialdehyde in human body fluids. *Free Radical Biology and Medicine*, 1996; 20(2):251-256.

13. Myhre O, Andersen JM, Aarnes H, Fonnum F. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. *Biochemical Pharmacology*, 2003; 65(10):1575-1582.
14. Ellman GL, Courtney D, Andres V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, 1961; 7(2):88-95.
15. Worek F, Mast U, Kiderlen D, Diepold C, Eyer P. Improved determination of acetylcholinesterase activity in human whole blood. *Clinica Chimica Acta*, 1999; 288(1): 73-90.
16. Nelson DP, Kiesow LA. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Analytical Biochemistry*, 1972; 49(2):474-478.
17. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1959; 82(1):70-77.
18. Sammour T, Kahokehr A, Hayes J, Hulme-Moir M, Hill AG. Warming and humidification of insufflation carbon dioxide in laparoscopic colonic surgery: a double-blinded randomized controlled trial. *Annals of Surgery*, 2010; 251(6):1024-1033.
19. Griep RB, Stinson EB, Shumway NE. Profound local hypothermia for myocardial protection during open-heart surgery. *Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*; 1973, 66(5):731-741.
20. Polderman KH. Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Critical Care Medicine*, 2009; 37(7):186-202.
21. Turk HM, Sevine A, Cameci C, Cigli A, Buyukberber S, Savli H, Bayraktar N. Plasma lipid peroxidation products and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetologica*, 2002; 39(3):117-122.

22. Salvi M, Battaglia V, Brunati AM, La Rocca N, Tibaldi E, Pietrangeli P, Marcocci L, Mondovi B, Rossi CA, Toninello A. Catalase takes part in rat liver mitochondria oxidative stress defense. *Journal of Biological Chemistry*, 2007; 282(33): 24407-24415.
23. Song CW, Chelstrom LM, Levitt SH, Haumschild DJ. Effects of temperature on blood circulation measured with the laser Doppler method. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physical*, 1989; 17(5):1041-1047.
24. Rosenfeldt F, Wilson M, Lee G, Kure C, Ou R, Braun L, Haan J. Oxidative stress in surgery in an ageing population: pathophysiology and therapy. *Experimental Gerontology*, 2013; 48(1):45-54.
25. Costa CMD, Santos RCCD, Lima ES. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 2006; 42:345-350.
26. Radi R, Bush KM, Cosgrove TP, Freeman BA. Reaction of xanthine oxidase-derived oxidants with lipid and protein of human plasma. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1991; 286(1):117-125.
27. Moran LK, Gutteridge JM, Quinlan GJ. Thiols in cellular redox signalling and control. *Current Medicinal Chemistry*, 2001; 8(7):763-72.
28. Baysal Z, Togrul T, Aksoy N, Cengiz M, Celik H, Boleken ME, Kaya M, Yavuz G. Evaluation of total oxidative and antioxidative status in pediatric patients undergoing laparoscopic surgery. *Journal of Pediatric Surgery*, 2009; 44(7):1367-1370.
29. Sare M, Yalmaz I, Hamamci D, Birincioglu M, Ozmen M, Yesilada O. The effect of carbon dioxide pneumoperitoneum on free radicals. *Surgical Endoscopy*, 2000; 14(7):649-52.

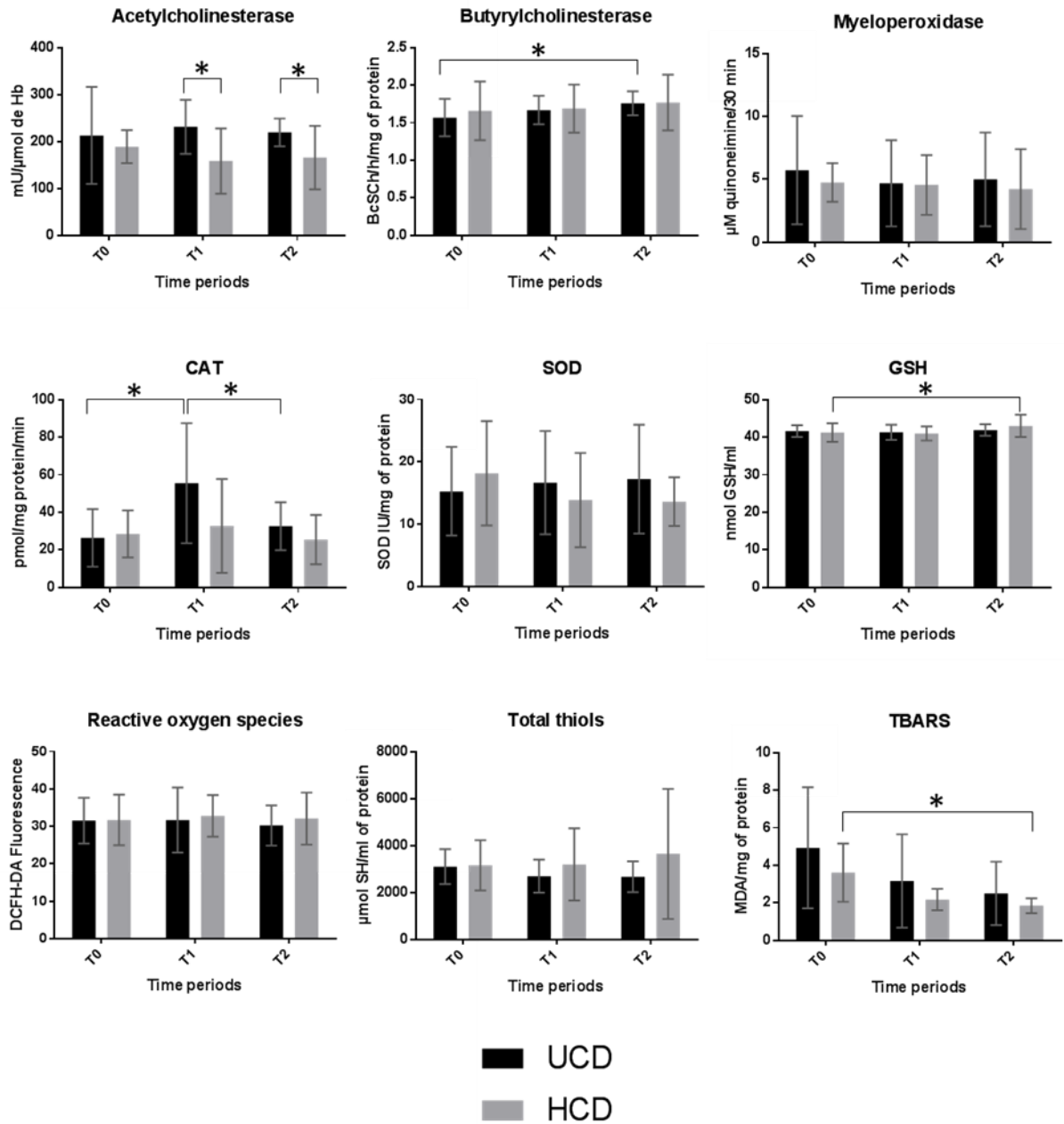


Figure 1. Serum inflammatory and oxidative stress biomarkers. (*) indicates significant difference ($p < 0.05$) between the groups and between time periods. T0: assessment before CO_2 insuflation, immediately after the onset of the surgical procedure; T1: after 30 minutes of exposure to CO_2 , when pressure reached 10 mmHg; T2: 60 minutes after initial CO_2 insuflation. HCD= heated carbon dioxide, UCD= Unheated carbon.

3. ARTIGO 2

TRABALHO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO
Periódico: Surgical Endoscopy
(INSS 0930-2794)

**ANÁLISE HISTOLÓGICA E ESTRESSE OXIDATIVO PERITONEAL
EM CADELAS SUBMETIDAS À PNEUMOPERITÔNIO AQUECIDO OU
NÃO EM OVARIOHISTERECTOMIAS VIDEOASSISTIDAS**

Análise histológica e estresse oxidativo peritoneal em cadelas submetidas à pneumoperitônio aquecido ou não em ovariohisterectomias videoassistidas

Vanessa Milech ^{1*}, Maurício Veloso Brun²

¹Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria

²Universidade Federal de Santa Maria- UFSM- Santa Maria, RS. Bolsista CNPq/Brasil (308019/2015-6; 200346/2017-2)

* Autor para correspondência: Avenida Roraima, 1000, 97195-000, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil, Telefone: +55 53 981486172, e-mail vanessamilech@gmail.com

3.1. Resumo

Introdução Os procedimentos laparoscópicos requerem a criação do pneumoperitônio, sendo o CO₂ frio e seco, o gás padrão utilizado nestas cirurgias. O tipo de gás utilizado, a sua temperatura e umidade podem levar a alterações na superfície peritoneal, bem como estresse oxidativo sistêmico e local. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência do CO₂ aquecido ou frio, em pacientes submetidas a ovariectomias videoassistidas, sobre a ocorrência de lesões na histologia peritoneal e estresse oxidativo na superfície mesotelial.

Métodos Foram distribuídas 20 fêmeas caninas igualmente nos grupos CO₂ aquecido (GAQ) e CO₂ frio (GNA), de forma aleatória. As biópsias do tecido peritoneal foram realizadas nos tempos (T0) antes da insuflação com CO₂, e (T1) após 60 minutos de exposição ao CO₂, sendo avaliados os parâmetros congestão, edema, hemorragia e presença de células inflamatórias na superfície peritoneal. Amostras de peritônio foram coletadas para análise de CAT, SOD e TBARS, nos tempos (T0), antes da insuflação da cavidade, (T1) após 30 minutos de exposição, e (T3) aos 60 minutos.

Resultados Não foram observadas diferenças nos parâmetros histológicos avaliados. Avaliando-se a atividade da CAT, o GAQ apresentou diferença entre T1 e T2 ($p=0,0150$), e comparando-se os grupos em cada momento, houve aumento no T2 ($p=0,0288$) do GAQ. Em relação a atividade da SOD, no GAQ houve diferença entre T2 em relação ao T0 e T1 ($p=0,0181$), na comparação entre grupos em mesmo momento, houve aumento apenas no T1 ($p=0,0287$) do GNA. Na avaliação do TBARS, não houve diferença entre os momentos ou grupos avaliados.

Conclusões A utilização do CO₂ aquecido em comparação ao CO₂ não aquecido, não demonstra mudanças na histologia peritoneal no período avaliado, entretanto, o gás aquecido ocasiona elevação em valores de marcadores de estresse oxidativo peritoneal (CAT e SOD), quando comparado ao grupo CO₂ não aquecido.

Palavras-chave: Peritônio. Histologia. Espécies reativas de oxigênio. Videocirurgia.

3.2.Introdução

A cirurgia laparoscópica induz a menor trauma tecidual, em decorrência das menores incisões cirúrgicas e disseções extensas dos tecidos, hemostasia minuciosa, utilização de instrumentais microcirúrgicos e menor campo operatório [1]. Estes procedimentos estão associados a menos dor no pós-operatório, menor depressão imunológica sistêmica, menor infecção da ferida, bem como complicações e hospitalizações mais curtas [2]. Tais cirurgias requerem a criação do pneumoperitônio, obtido através da insuflação peritoneal, utilizando-se o CO₂ seco (0,5% umidade relativa) a uma temperatura de 20-25°C [3]. Este CO₂ padrão seco e frio é atualmente o gás de escolha para a laparoscopia, cumprindo a maioria dos requisitos para um gás de insuflação ideal, sendo incolor, inerte, não inflamável e rapidamente excretado pela circulação [4].

O peritônio é a membrana serosa que recobre a cavidade abdominal e a maioria dos órgãos intra-abdominais, sendo que, o seu revestimento superficial consiste em células mesoteliais altamente diferenciadas. Dessa forma, a superfície peritoneal apresenta importância funcional na cavidade abdominal, diminuindo o atrito da parede, servindo como barreira para a infecção e permitindo a secreção de citocinas [1]. Segundo Brokelman *et al.* [2], ao mesmo tempo que o caráter minimamente invasivo da cirurgia laparoscópica pode reduzir o trauma cirúrgico no peritônio, os procedimentos laparoscópicos introduzem novos elementos na cavidade abdominal como o aumento da pressão abdominal, os gases de insuflação e a mudança de temperatura e umidade, que podem afetar a integridade e biologia peritoneal.

A superfície peritoneal é uma camada bastante suscetível a danos e condições variáveis, como o CO₂ frio e seco durante a cirurgia laparoscópica [1]. Assim, a difusão do gás na cavidade abdominal poderia ser responsável por lesões de desidratação peritoneal e resfriamento, que podem levar a hipotermia intra-operatória e, estar diretamente ligada ao maior tempo de recuperação e outras complicações como dor e formação de aderências abdominais [3]. O CO₂ seco e frio utilizado no pneumoperitônio pode não só induzir a desidratação peritoneal, mas também alterar a morfologia do mesotélio, destruindo as microvilosidades, levando a proeminência das células com exposição da lâmina basal [5].

As lesões no peritônio no momento da cirurgia causam liberação rápida de plaquetas, fibrinogênio, histamina e aminas vasoativas, resultando em ruptura da microcirculação peritoneal. A geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) também é observada, e a remoção inadequada e/ou altos níveis destes produtos resultam em estresse oxidativo, que pode

causar graves disfunções metabólicas e dano celular [6]. A superóxido dismutase (SOD), a glutathiona peroxidase (GPx) e a catalase (CAT) são enzimas importantes nos mecanismos intracelulares de defesa do sistema antioxidante, e são utilizadas como marcadores de estresse oxidativo [7]. Da mesma forma, o malondialdeído (MDA), sendo o principal marcador da peroxidação lipídica [8].

Diversos trabalhos analisam conjuntamente os fatores temperatura e umidade do gás na histologia peritoneal, porém, da mesma forma relacionado a avaliação de biomarcadores de estresse oxidativo local, não foram observados estudos analisando a temperatura isoladamente, aplicada em cães ou em pacientes submetidos à cirurgia de rotina. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência do CO₂ aquecido ou não, em pacientes submetidas a ovariectomias (OVH) videoassistidas, sobre a ocorrência de lesões na histologia peritoneal, bem como estresse oxidativo local.

3.3. Material e métodos

3.3.1. Seleção de pacientes

Este estudo teve a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais em Ensino e Pesquisa (CEUA), sob o protocolo nº 3883261216. Foram incluídas neste trabalho 20 fêmeas da espécie canina, sem raça definida (SRD), adultas de até oito anos de idade, com massa corporal média de $18,99 \pm 3,87$ Kg, encaminhadas ao Hospital Veterinário Universitário da Universidade Federal de Santa Maria (HVU-UFSM), para realização de OVH eletivas. Os animais do presente estudos se referem a mesma amostra do trabalho prévio. Anteriormente ao procedimento cirúrgico, as pacientes eram submetidas ao exame clínico geral, seguido de exames laboratoriais (hemograma, contagem plaquetária e bioquímica sérica hepática e renal) e ultrassonografia abdominal (US), para avaliação do trato genital. Além disso, recebiam jejum alimentar domiciliar pré-operatório de 12 horas para sólidos e seis para líquidos. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos (n=10 cada), sendo o primeiro submetido ao pneumoperitônio com CO₂ não aquecido (GNA) e o segundo ao pneumoperitônio de CO₂ aquecido (GAQ) a temperatura de 37°C.

3.3.2. Procedimento anestésico

A medicação pré-anestésica (MPA) utilizada foi o cloridrato de tramadol (4 mg/kg, via intramuscular) - (Cloridrato de Tramadol 100 mg/2mL[®], Teuto, Brasil). Sendo a tricotomia do campo operatório e do local do acesso venoso, realizada após 15 min. da aplicação da MPA. A

fluidoterapia com solução de Ringer lactato de sódio, era utilizada na velocidade de 10 ml/kg/hora (Ringer com lactato, Sanobiol[®], Brasil), sendo efetuada a indução anestésica com propofol (4 mg/kg, IV) - (Diprivan1%[®], Cristália, Brasil), e posterior manutenção anestésica com isoflurano (1CAM) - (Isoforine[®], Cristália, Brasil) vaporizado em oxigênio a 100%. Utilizava-se a quimioprofilaxia antimicrobiana com cefalotina (30 mg/kg, IV) - (Cefalotina sódica 1g[®], ABL, Brasil), 30 min. antes da cirurgia. A temperatura dos animais era monitorada constantemente, e a temperatura da sala cirúrgica era mantida entre 25-27°C.

3.3.3. Procedimento cirúrgico

A técnica cirúrgica de ovariohisterectomia videoassistida com dois portais (Fig. 1A), foi padronizada, sendo o primeiro portal (10 mm) inserido na cicatriz umbilical pela técnica aberta, e o segundo (10 mm), sob visibilização da óptica, na linha media e região pré-púbica. Foi mantida a pressão de 10 mmHg no pneumoperitônio e velocidade constante de 2 L/min. As feridas de acesso eram suturadas em três planos, mediante sutura de Sultan na camada muscular, seguido da aplicação de mesmo padrão de sutura no tecido subcutâneo, e pele em padrão Wolff. A analgesia pós-operatória foi prescrita por mais três dias seguidos, obedecendo os intervalos de 24 horas e oito horas, sendo composta por meloxicam (0,1 mg/kg) - (Maxicam 0,2%[®], Ourofino, Brasil), e uma associação de dipirona sódica (25 mg/kg) e N-butilescolamina (0,2 mg/kg) - (Buscofin Composto[®], Agener União, Brasil), respectivamente.

3.3.4. Análise histológica

Uma amostra de aproximadamente 0,5 cm de largura x 0,5 cm de comprimento era coletada em dois momentos: No tempo 0 (T0), antes do início da insuflação, e no tempo 1 (T1), após contínuos 60 minutos de exposição da cavidade abdominal à aplicação de CO₂ aquecido ou não. Para tanto, utilizava-se uma pinça para biópsia de videocirurgia do tipo sacabocado para as coletas de amostras do peritônio do quadrante cranial esquerdo (T0) (Fig. 1B) e quadrante cranial direito (T1) - (Fig. 1D), repetindo-se a ordem dessas coletas, a cada paciente. As amostras (Fig. 1C) foram fixadas em formalina a 10% tamponada neutra, embebidas em parafina, clivadas, e coradas com hematoxilina eosina em lamina onde posteriormente foram avaliadas por meio de microscopia óptica de luz. A avaliação foi realizada por dois patologistas independentes, que desconheciam a procedência dos animais em cada grupo. Na superfície peritoneal foram avaliadas a presença de congestão, hemorragia, edema e células inflamatórias. As alterações histológicas citadas foram avaliadas segundo a metodologia adaptada de Papparella *et al.* [9], onde foram atribuídas pontuações para cada lesão encontrada, sendo 0,

indicativo de ausência de alterações; 1, alterações leves (menos de 10%); 2, mudanças moderadas (entre 10 e 50%); e 3, alterações acentuadas (mais de 50%).

3.3.5. Análise de estresse oxidativo

A avaliação do estresse oxidativo foi realizada pelas análises de biomarcadores de tecido peritoneal. No total, eram coletadas três amostras de aproximadamente 0,5 cm de largura x 0,5 cm de comprimento, em três momentos distintos, em ambos os grupos. Os momentos correspondem a tempo 0 (T0), antes do início da insuflação, tempo 1 (T1), após contínuos 30 minutos de exposição da cavidade abdominal à aplicação de CO₂ aquecido ou não, e tempo 2 (T2), 60 minutos após o início da aplicação de CO₂. Da mesma forma que nas coletas para a histologia, utilizava-se a mesma pinça para biópsia de videocirurgia do tipo sacabocado para coletas no quadrante cranial esquerdo (T0) (Fig. 1B) e no quadrante cranial direito (T1 e T2) - (Fig. 1D).

A atividade da SOD foi realizada seguindo Mccord e Fridovich [10]. O ensaio foi realizado num volume total de 1 ml contendo 50 mmol de tampão de glicina (pH 10), 60 mmol de epinefrina, e a alíquota de homogenato de peritônio S1 previamente homogeneizado em tampão fosfato (1:5) e centrifugadas a 22000 rpm durante 20 minutos. A epinefrina era adicionada, sendo a formação de adrenocromo registrada a 480 nm com espectrofotômetro de ultravioleta-visível (UV-VIS), durante 4 min. Os resultados são aqui apresentados em SOD IU/mg de proteína.

Níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), em amostras de biópsia peritoneal, foram determinados de acordo com o método descrito por Ohkawa *et al.* [11], considerando a medição da concentração de MDA como um produto da peroxidação lipídica, por meio de reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA), sendo expressos em nmol de MDA/mg de proteína.

A atividade de CAT foi medida utilizando o método de Nelson e Kiesow [12]. Para o ensaio, as alíquotas de homogenato de peritônio S1 previamente homogeneizado em tampão fosfato (1:5) e centrifugadas a 22000 rpm durante 20 minutos, eram adicionadas a uma mistura de reação que continha tampão de 50 mM de fosfato de potássio (pH 7,4), H₂O₂ a 10 mM e 20 µL de amostra. A taxa de reação de H₂O₂ foi monitorizada a 240 nm durante 2 min. à temperatura ambiente. A atividade enzimática foi expressa em nmol/mg/proteína/min.

3.3.6. Estatística

Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para avaliação dos parâmetros histológicos (congestão, hemorragia, edema e células inflamatórias) a comparação entre momentos dentro dos grupos foi realizada empregando-se teste de Wilcoxon para medidas pareadas. Para comparação entre grupos em cada momento isoladamente, empregou-se o teste de Mann-Whitney. Os dados das variáveis distribuídas de maneira não gaussiana foram expressos em mediana (valor mínimo-máximo). O nível de significância adotado foi de 5%.

Os dados relativos ao estresse oxidativo foram submetidos ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Para comparações dentro dos grupos, entre momentos, empregou-se ANOVA de via única para amostras repetidas e teste *post-hoc* de Bonferroni para comparação aos pares. Para comparações entre grupos, em cada momento isoladamente, empregou-se o teste *t* não pareado (bicaudal). Para todas as análises, considerou-se nível de significância de 5%.

3.4. Resultados

Não houve complicações no trans ou pós-operatório. As pacientes que apresentavam quaisquer alterações clínicas ou alterações do sistema reprodutor, na realização do exame ultrassonográfico, não eram incluídas neste estudo. Da mesma forma, foi preconizado controle sobre todas as medicações utilizados, bem como o tempo de avaliações. Ainda, a temperatura da sala cirúrgica, e das pacientes foi monitorada durante todo o procedimento cirúrgico.

Em relação a análise histológica, as variáveis congestão, hemorragia, edema e presença de células inflamatórias não apresentaram diferença dentro dos tempos em um mesmo grupo e, ao se comparar os diferentes tempos entre os grupos (Tabela 1).

Avaliando-se a atividade da CAT, no GAQ, houve diferença ($p=0,0150$) entre momentos, tendo T1 apresentado menor valor que T2. Os momentos T1 e T2 não diferiram em relação ao basal. No GNA, não houve diferença entre os momentos. Comparando-se os grupos em cada momento isoladamente, houve diferença no T2 ($p=0,0288$), em que o GNA apresentou menores valores ($29,55\pm 19,44$) que o GAQ ($89,15\pm 71,28$) - (Tabela 2).

Em relação a atividade da SOD (Tabela 2) no GAQ houve diferença ($p=0,0181$) entre momentos. Houve aumento significativo no T2, tanto em relação ao basal quanto em T1. O momento T1 não diferiu do basal. No GNA, não houve diferença entre os momentos. Comparando-se os grupos em cada momento isoladamente, houve diferença apenas no T1 ($p=0,0287$), em que o GAQ apresentou menores valores que GNA.

Segundo demonstrado na Tabela 2, na avaliação do TBARS, observou-se que no GAQ, não houve diferença entre momentos, sendo que, o mesmo ocorreu no GNA. Comparando-se os grupos, também não houve diferença em nenhum dos momentos avaliados.

3.5. Discussão

Ainda que a análise histológica não tenha demonstrado nenhuma alteração significativa, entre os grupos ou momentos avaliados neste estudo, deve-se considerar que por ser uma estrutura bastante delicada, o peritônio não está adaptado a suportar condições variáveis, tal como a introdução de gás seco e frio na cavidade abdominal. Dessa forma, o tipo de gás insuflado na cavidade abdominal (CO₂ ou outros), a natureza do gás (temperatura e umidade), a pressão e a extensão de exposição a esse gás (temperatura e volume) são fatores que causam danos aos tecidos. Sendo frio ou aquecido, o gás seco pode levar a desidratação celular. Quanto mais quente a temperatura do gás, maior será a capacidade de evaporação, pois o gás pode aumentar o vapor de água, logo, o peritônio poderá secar mais rapidamente, o que potencialmente leva a maiores efeitos adversos [1, 2].

Mudanças relacionadas a alterações estruturais na superfície peritoneal, danos celulares e resposta inflamatória devem ser avaliadas na histologia [9, 13], fundamentando os parâmetros congestão, edema, hemorragia e presença de células inflamatórias, analisados neste estudo. Justificando à ausência de alterações na histologia do presente estudo, primeiramente devemos ponderar que embora a grande maioria dos estudos seja em modelos animais [4, 14, 16, 17], a diferença entre as espécies deve ser considerada. A espécie canina foi utilizada pelo experimento ter sido concomitantemente realizado junto a um procedimento cirúrgico de rotina que estava indicado para os animais experimentais (OVH eletiva). Assim, a avaliação só foi estendida ao tempo máximo de 60 minutos, fundamentado no tempo que incluía os limites da realização da cirurgia proposta e de alguns outros procedimentos laparoscópicos realizados na rotina cirúrgica de pequenos animais, além de objetivar a avaliação da resposta inflamatória e estresse oxidativo de fase aguda. O tempo de avaliação foi bastante variável nos diferentes estudos, sendo os animais submetidos a 30 minutos [17], 50 minutos [14] e 120 minutos [4, 16] de exposição ao pneumoperitônio. Já a coleta da amostra peritoneal e avaliação histológica poderia chegar a até 96 horas [17] na busca de alterações, diferentemente do que foi realizado no presente estudo, sendo a última coleta de amostras realizada aos 60 minutos. Erikoglu *et al.* [4], observaram por meio da utilização de microscopia eletrônica que o CO₂ aquecido e umidificado resultou em menores alterações peritoneais em comparação ao CO₂ frio e seco. Esses resultados contrastam com o estudo de Hazebroek *et al.* [16], que concluíram que as

mudanças na superfície peritoneal ocorrem após a insuflação de CO₂, independente se o gás é aquecido ou umidificado. Já Glew *et al.* [14], avaliando a utilização do CO₂ frio e seco, e o CO₂ aquecido e umidificado em suínos, no período de exposição de 50 minutos, não demonstrou dano estrutural na superfície peritoneal.

Conforme descrito por Aran *et al.* [18], o pneumoperitônio leva a redução no fluxo sanguíneo, que varia entre 10-80% no fluxo sanguíneo para os órgãos abdominais, sendo normalizado após a desinsuflação da cavidade abdominal, resultando muitas vezes em evidência bioquímica de estresse oxidativo e evidência histológica de lesão tecidual, sendo assim, a laparoscopia se configura como modelo de lesão de isquemia e reperfusão em órgãos e tecidos. Dessa forma, a ocorrência de lesões peritoneais poderia ser justificada pela avaliação do tecido após o evento de reperfusão, fato não observado no presente estudo onde as coletas foram realizadas ainda no momento em que a cavidade estava insuflada com o CO₂.

Outra justificativa plausível para a ausência de alterações observadas neste estudo pode estar associada à utilização de microscopia óptica, em vez de microscopia eletrônica. Estudos realizados [4, 13 e 16] utilizando microscopia eletrônica de varredura, demonstraram que esta ferramenta pode ser mais sensível em detectar alterações como o aparecimento de fissuras intercelulares visíveis, perda de microvilosidades, descamação das células mesoteliais e exposição da lâmina basal, presença de células mesoteliais retraídas e/ou abauladas, além da presença de macrófagos e linfócitos, condições que muitas vezes não podem ser detectadas com a utilização de microscopia óptica. Ainda assim, vale ressaltar que outros estudos avaliando os efeitos do CO₂ aquecido e umidificado sob o peritônio, demonstram uma diminuição no ressecamento e alterações no mesmo, sugerindo que o gás desta forma poderia ter efeito benéfico nos casos de peritonite e câncer, conservando as propriedades do peritônio como barreira contra microrganismos e células cancerígenas [29].

Em relação à SOD, foi visto que, aos 30 minutos de exposição ao gás (T1), o GNA apresentou valores maiores em relação ao GAQ, o que pode ser ocasionado pelo aumento da demanda por energia. Quando o gás seco e frio é insuflado no abdômen quente, ele é umidificado e aquecido até atingir um equilíbrio com o peritônio, o mesmo perderá temperatura e líquido para alcançar esse equilíbrio, consumindo mais energia e induzindo a hipotermia [1]. Porém, é mais fácil para o corpo aquecer o gás frio utilizado na insuflação, do que a temperatura corporal alterar em função do ar frio insuflado, o que pode ser explicado pelo coeficiente de calor específico do sangue, maior que o do gás [20]. Por apresentar maior gasto de energia com a umidificação e temperatura do gás, o aumento da atividade enzimática da SOD no GNA, já

pode ser observado aos 30 minutos de exposição (T1), quando comparado ao GAQ. Ainda assim, tendo em vista que a SOD é responsável por catalisar a reação de superóxido em peróxido de hidrogênio, considerada uma das principais reações do sistema antioxidante enzimático contra o radical superóxido [22], podemos supor que ela foi efetiva na sua função, uma vez que não houve aumento da CAT, no mesmo grupo e tempo avaliado.

Avaliando ainda a atividade da SOD, verificou-se que houve um aumento durante o T2, em comparação ao T0 e T1, no GAQ. Também foi observado aumento na atividade da CAT no mesmo grupo, no momento T2 em relação ao T1. Ainda, comparando os grupos, houve aumento no T2 do GAQ. Tais resultados podem demonstrar que houve maior geração de ROS no GAQ aos 60 min. de exposição ao gás aquecido, sendo que a atividade da SOD foi insuficiente, e a CAT aumentou a sua atividade para reduzir o peróxido de hidrogênio de forma complementar. Ainda que possa haver maior gasto de energia quando o peritônio é submetido a um gás frio e seco na tentativa de umidificar e aquecer o meio, deve-se levar em consideração que um tecido esfriado em condições de hipotermia possui menores exigências metabólicas [22], sendo que a quantidade de EROS gerada pode ser reduzida em relação ao ambiente exposto ao gás aquecido. Contudo, não se pode prever por quanto tempo de exposição ao gás não aquecido essa tendência de resposta possa se manter, já que o limite de avaliação foi de 60 minutos.

Na avaliação dos níveis de TBARS, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos ou momentos avaliados, indicando que a alteração das enzimas antioxidantes não permitiu que houvesse um aumento da peroxidação lipídica. Quando os lipídeos são alvos do estresse oxidativo, há geração de produtos secundários que agravam os danos oxidativos. O malondialdeído é utilizado como indicador de atuação de EROS, sendo o principal produto resultante da peroxidação lipídica, tendo como efeito nas células a disfunção progressiva e perda da permeabilidade da membrana, danos ao DNA e degradação de proteínas estruturais [23, 24].

Traumas e lesões cirúrgicas estão associados ao aumento na produção de EROS e ativação do sistema antioxidante, particularmente quando associado à isquemia do tecido, seguido de reperfusão [25]. A insuflação abdominal e o aumento da pressão intra-abdominal podem produzir isquemia orgânica significativa, seguida de lesão por reperfusão após a deflação do abdômen, sendo o principal modelo de isquemia e/ou reperfusão [8, 26]. Vale ressaltar ainda, que as EROS produzidas por reperfusão desempenham um papel crítico na lesão causada pela mesma, devido a produção de metabólitos tóxicos [25]. O presente trabalho evidenciou que a prática de insuflação com CO₂ aquecido pode levar a alteração de biomarcadores,

diferentemente do estudo realizado por Sammour *et al.* [27], que avaliaram como indicadores de estresse oxidativo a proteína carbonil e o MDA no período de reperfusão, após 110 minutos de exposição ao CO₂, demonstrando que o aquecimento e umidificação do gás de insuflação não teve efeito nestes indicadores de estresse oxidativo, quando comparado ao gás não aquecido e não umidificado.

3.6. Conclusões

A utilização do CO₂ aquecido em comparação ao CO₂ não aquecido conforme a metodologia empregada, não demonstrou mudanças na histologia peritoneal, entretanto, o uso de gás aquecido demonstrou aumento em valores de marcadores de estresse oxidativo peritoneal (Catalase e Superóxido dismutase). Todavia, ainda são necessários estudos em cães e outras espécies, para avaliar o real impacto da estratégia de aquecer o gás, especialmente em procedimentos cirúrgicos mais longos que podem expor a um maior risco de complicações no pós-operatório.

3.7.Referências

1. Binda MM (2015) Humidification during laparoscopic surgery: overview of the clinical benefits of using humidified gas during laparoscopic surgery. *Archives of gynecology and obstetrics* 292 (5):955-971. doi:10.1007/s00404-015-3717-y
2. Brokelman WJA, Lensvelt M, Rinkes IHMB, Klinkenbijnl JHG, Reijnen MMPJ (2011) Peritoneal changes due to laparoscopic surgery. *Surgical endoscopy* 25 (1):1-9. doi:10.1007/s00464-010-1139-2
3. Balayssac D, Pereira B, Bazin JE, Le Roy B, Pezet D, Gagniere J (2017) Warmed and humidified carbon dioxide for abdominal laparoscopic surgery: meta-analysis of the current literature. *Surgical endoscopy* 31 (1):1-12. doi:10.1007/s00464-016-4866-1
4. Erikoglu M, Yol S, Avunduk MC, Erdemli E, Can A (2005) Electron-microscopic alterations of the peritoneum after both cold and heated carbon dioxide pneumoperitoneum. *The Journal of surgical research* 125 (1):73-77. doi:10.1016/j.jss.2004.11.029
5. Binda MM, Molinas CR, Hansen P, Koninckx PR (2006) Effect of desiccation and temperature during laparoscopy on adhesion formation in mice. *Fertil Steril* 86 (1):166-175. doi:10.1016/j.fertnstert.2005.11.079
6. Bentes de Souza AM, Rogers MS, Wang CC, Yuen PM, Ng PS (2003) Comparison of peritoneal oxidative stress during laparoscopy and laparotomy. *The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists* 10 (1):65-74
7. Dalgic T, Oymaci E, Bostanci EB, Cakir T, Kece C, Erguder I, Akoglu M (2015) Effects of carbon dioxide pneumoperitoneum on postoperative adhesion formation and oxidative stress in a rat cecal abrasion model. *International journal of surgery (London, England)* 21:57-62. doi:10.1016/j.ijssu.2015.06.082
8. 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 (1):363-368. doi:10.1016/j.fertnstert.2008.05.047
9. Papparella A, Nino F, Coppola S, Noviello C, Paciello O, Papparella S (2014) Peritoneal morphological changes due to pneumoperitoneum: the effect of intra-abdominal pressure. *European journal of pediatric surgery: official journal of Austrian Association of Pediatric Surgery [et al] = Zeitschrift fur Kinderchirurgie* 24 (4):322-327. doi:10.1055/s-0033-1349057
10. McCord JM, Fridovich I (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry* 244 (22):6049-6055
11. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical biochemistry* 95 (2):351-358

12. Nelson DP, Kiesow LA (1972) Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25 degrees C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). *Analytical biochemistry* 49 (2):474-478
13. Peng Y, Zheng M, Ye Q, Chen X, Yu B, Liu B (2009) Heated and humidified CO₂ prevents hypothermia, peritoneal injury, and intra-abdominal adhesions during prolonged laparoscopic insufflations. *The Journal of surgical research* 151 (1):40-47. doi:10.1016/j.jss.2008.03.039
14. Glew PA, Campher MJ, Pearson K, Schofield JC, Davey AK (2004) The effect of warm humidified CO₂ on the dissipation of residual gas following laparoscopy in piglets. *The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists* 11 (2):204-210
15. Scott J, Valverde A, Blois S, Kilkenny J, Foster R, Singh A (2017). Effect of Warmed and Humidified Carbon Dioxide for Pneumoperitoneum on Inflammation and Thromboelastography During Laparoscopy in Healthy, Mature Dogs. *Veterinary Endoscopy Society 14th Annual Scientific Meeting June 20-22, Cabo San Lucas, Mexico.*
16. Hazebroek EJ, Schreve MA, Visser P, De Bruin RW, Marquet RL, Bonjer HJ (2002) Impact of temperature and humidity of carbon dioxide pneumoperitoneum on body temperature and peritoneal morphology. *Journal of laparoendoscopic & advanced surgical techniques Part A* 12 (5):355-364. doi:10.1089/109264202320884108
17. Volz J, Koster S, Spacek Z, Paweletz N (1999) Characteristic alterations of the peritoneum after carbon dioxide pneumoperitoneum. *Surgical endoscopy* 13 (6):611-614
18. Aran T, Unsal MA, Guven S, Kart C, Cetin EC, Alver A Carbon dioxide pneumoperitoneum induces systemic oxidative stress: a clinical study. *European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology* 161 (1):80-83. doi:10.1016/j.ejogrb.2011.11.027
19. Finkel T, Holbrook NJ (2000) Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408 (6809):239-247. doi:10.1038/35041687
20. Saad S, Minor I, Mohri T, Nagelschmidt M (2000) The clinical impact of warmed insufflation carbon dioxide gas for laparoscopic cholecystectomy. *Surgical endoscopy* 14 (9):787-790
21. Tunon MJ, Gonzalez P, Jorquera F, Llorente A, Gonzalo-Orden M, Gonzalez-Gallego J (1999) Liver blood flow changes during laparoscopic surgery in pigs. A study of hepatic indocyanine green removal. *Surgical endoscopy* 13 (7):668-672
22. Polderman KH (2009) Mechanisms of action, physiological effects, and complications of hypothermia. *Critical care medicine* 37 (7 Suppl): S186-202. doi:10.1097/CCM.0b013e3181aa5241

23. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N (2005) A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutrition, metabolism, and cardiovascular diseases: NMCD* 15 (4):316-328. doi:10.1016/j.numecd.2005.05.003
24. Vajdovich P (2008) Free radicals and antioxidants in inflammatory processes and ischemia-reperfusion injury. *The Veterinary clinics of North America Small animal practice* 38 (1):31-123, v. doi:10.1016/j.cvsm.2007.11.008
25. Baysal Z, Togrul T, Aksoy N, Cengiz M, Celik H, Boleken ME, Kaya M, Yavuz G (2009) Evaluation of total oxidative and antioxidative status in pediatric patients undergoing laparoscopic surgery. *J Pediatr Surg* 44 (7):1367-1370. doi:10.1016/j.jpedsurg.2008.11.031
26. Sammour T, Mittal A, Loveday BP, Kahokehr A, Phillips AR, Windsor JA, Hill AG (2009) Systematic review of oxidative stress associated with pneumoperitoneum. *The British journal of surgery* 96 (8):836-850. doi:10.1002/bjs.6651
27. Sammour T, Mittal A, Delahunt B, Phillips AR, Hill AG (2011) Warming and humidification have no effect on oxidative stress during pneumoperitoneum in rats. *Minimally invasive therapy & allied technologies: MITAT: official journal of the Society for Minimally Invasive Therapy* 20 (6):329-337. doi:10.3109/13645706.2011.556647

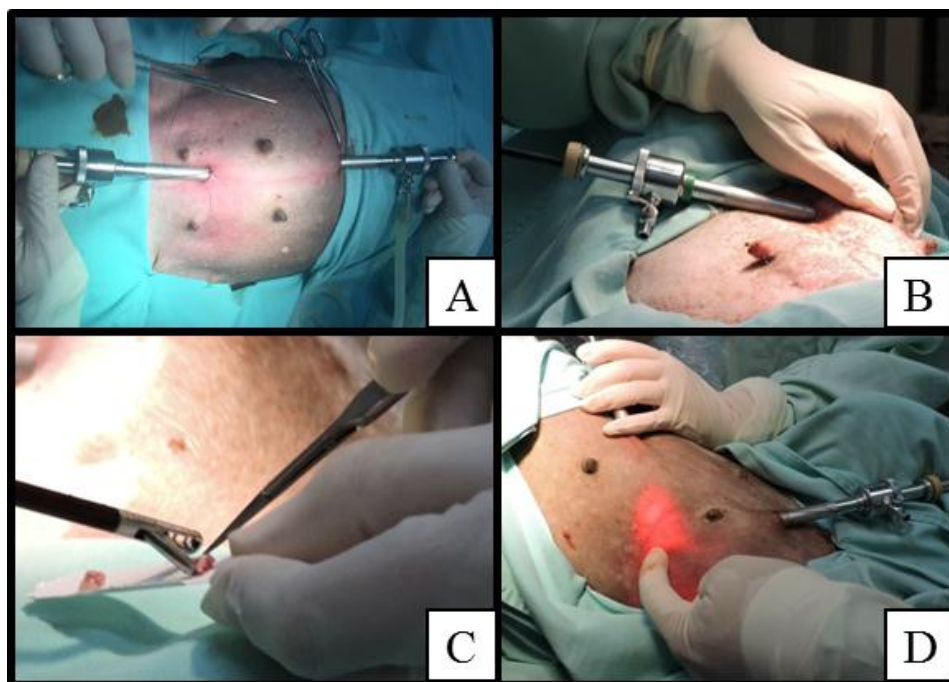


Figura 2. (A) Posicionamento dos portais para a técnica de ovariectomia videoassistida nos animais experimentais. (B) Momento da biópsia peritoneal para histologia peritoneal e avaliação do estresse oxidativo no T0. Note que a mão do cirurgião apoia externamente a parede muscular para coleta. (C) Amostras de tecido peritoneal após biópsia. (D) Biópsia peritoneal para histologia peritoneal no T1, e avaliação estresse oxidativo no T1 e T2.

Tabela 1. Médias (\pm DP) da avaliação histológica do peritônio em cadelas submetidas a pneumoperitônio com CO₂ aquecido ou não, no momento basal (T0), aos 30 minutos (T1) e 60 minutos (T2) de exposição ao CO₂.

Grupo	Tempo	Congestão	Hemorragia	Edema	Células Inflamatórias
GAQ	0	0,1 (\pm 0,3)	0,2 (\pm 0,4)	0,1 (\pm 0,3)	0
GNA	0	0,2 (\pm 0,4)	0,3 (\pm 0,64)	0	0
GAQ	1	0,3 (\pm 0,46)	0,3 (\pm 0,64)	0	0
GNA	1	0,3 (\pm 0,64)	0,5 (\pm 0,81)	0,2 (\pm 0,4)	0,2 (\pm 0,6)

Tabela 2. Médias (\pm DP) da análise peritoneal de CAT, SOD e TBARS em cadelas submetidas à pneumoperitônio com CO₂ aquecido ou não, no momento basal (T0), aos 30 minutos (T1) e 60 minutos de exposição ao CO₂ (T2).

Variável/grupo	MOMENTOS			<i>p</i> * (ANOVA)
	T0	T1	T2	
SOD				
GAQ	85,64 (\pm 74,31) ^a	87,56 (\pm 65,53) ^a	253,19 (\pm 164,07) ^b	0,0181
GNA	92,96 (\pm 74,16)	246,29 (\pm 182,25)	195,65 (\pm 301,69)	0,3759
<i>p</i> * (Teste T)	0,8381	0,0287	0,6266	
CAT				
GAQ	39,96 (\pm 42,90) ^a	24,52 (\pm 16,11) ^{ab}	89,15 (\pm 71,28) ^{ac}	0,0150
GNA	43,47 (\pm 70,49)	62,05 (\pm 50,42)	29,55 (\pm 19,440)	0,1526
<i>p</i> * (Teste T)	0,9058	0,1069	0,0288	
TBARS				
GAQ	148,95 (\pm 2,42)	149,35 (\pm 0,87)	149,81 (\pm 3,30)	0,7420
GNA	147,67 (\pm 2,07)	149,57 (\pm 2,59)	149,63 (\pm 2,20)	0,1243
<i>p</i> * (Teste T)	0,219	0,8003	0,8918	

*Resultado do teste *t* para comparação entre grupos. Letras minúsculas sobrescritas iguais correspondem à ausência de diferença à ANOVA para medidas repetidas entre momentos. Letras minúsculas sobrescritas diferentes correspondem à presença de diferença à ANOVA para medidas repetidas entre momentos.

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos estudos experimentais trazidos nessa dissertação verificou-se que cadelas submetidas à pneumoperitônio com CO₂ aquecido ou não aquecido, não apresentam alterações na histologia peritoneal. Entretanto, nas análises de biomarcadores séricos de inflamação e estresse oxidativo, foi observado que aquelas pacientes submetidas ao gás aquecido dentro do período proposto tiveram maior inflamação, além do aumento na atividade da catalase. Este fato também foi observado no tecido peritoneal, que evidenciou alteração nas atividades de catalase e superóxido dismutase no grupo aquecido, possivelmente indicando estresse oxidativo.

5. REFERÊNCIAS

- ARSALANI-ZADEH, R. et al. Oxidative Stress in Laparoscopic Versus Open Abdominal Surgery: A Systematic Review. **Journal of Surgical Research**, v.169, n.1, p. 59-68, 2011.
- BALAYSSAC, D. et al. Warmed and humidified carbon dioxide for abdominal laparoscopic surgery: meta-analysis of the current literature. **Surgical Endoscopy**, v. 31, n. 1, p. 1-12, 2016.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**., v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.
- BASSO, P.C. et al. Atualidades em videocirurgia na medicina veterinária: cirurgia endoscópica transluminal por orifícios naturais (NOTES) e cirurgia laparoendoscópica por único portal (LESS). **Revista Científica MEDVEP**, v. 10, n. 30. p. 82-89, 2012.
- DAS, U. N. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase as markers of low-grade systemic inflammation. **Annals Hepatology**, v. 11, n. 3, p. 409-411, 2012.
- DAVIDSON, E. B.; MOLL, H. D.; PAYTON, M. E. Comparison of laparoscopic ovariohysterectomy and ovariohysterectomy in dogs. **Veterinary Surgery**, v. 33, n. 1, p. 62-69, 2004.
- DUQUE, C. T. N.; MORENO, J. C. D. Anestesia e analgesia para videolaparoscopia. In: BRUN, M. V. **Videocirurgia em pequenos animais**. 1º ed. Rio de Janeiro: Editora Roca, 2015. Cap. 2, p. 7- 20.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse Oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.
- FERREIRA, M. P. et al. Ovário-salpingo-histerectomia videolaparoscópica em gatos domésticos: técnica com dois portais. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 39, n. 4, p. 1-5, 2011.
- FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v.408, n.6809, p.239-247, 2000.
- GLEW, P. A. et al. The effect of warm humidified CO2 on the dissipation of residual gas following laparoscopy in piglets. **The Journal of the American Association of Gynecologic Laparoscopists**, v. 11, n. 2, p. 204-210, 2004.

- HAZEBROEK, E. J. et al. Impact of temperature and humidity of carbon dioxide pneumoperitoneum on body temperature and peritoneal morphology. **Journal of Laparoendoscopic & Advanced Surgical Techniques**, v. 12, n. 5, p. 355-364, 2002.
- HEDLUND, C. S. Cirurgias do sistema reprodutivo e genital. In: FOSSUM, T. W. **Cirurgia de pequenos animais**. 3º ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2008. Cap. 26, p.702-774.
- HERRMANN, A.; DE WILDE, R. L. Insufflation with humidified and heated carbon dioxide in short-term laparoscopy: a double-blinded randomized controlled trial. **Biomed Research International**, v. 2015, p. 412-618, 2015.
- HOY, A. et al. Growing Significance of Myeloperoxidase in Non-infectious Diseases. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, v. 40, n. 1, p.2–8, 2002.
- MALM, C. et al. Ovário-histerectomia: estudo experimental comparativo entre as abordagens laparoscópica e aberta na espécie canina- III. Estresse pela análise do cortisol plasmático. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 5, p. 584-590, 2005.
- PAPPARELLA, A. et al. Peritoneal morphological changes due to pneumoperitoneum: the effect of intra-abdominal pressure. **European Journal of Pediatric Surgery**, v. 24, n. 4, p. 322-327, 2014.
- PENG, Y. et al. Heated and humidified CO2 prevents hypothermia, peritoneal injury, and intra-abdominal adhesions during prolonged laparoscopic insufflations. **Journal of Surgical Research**, v. 151, n. 1, p. 40-47, 2009.
- TARHAN, O. R. et al. Structural deteriorations of the human peritoneum during laparoscopic cholecystectomy. A transmission electron microscopic study. **Surgical Endoscopy**, v. 27, n. 8, p. 2744-2750, 2013.
- SILVA, M. A. M. et al. Surgical time and complications of total transvaginal (total-NOTES), single-port laparoscopic-assisted and conventional ovariohysterectomy in bitches. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 67, n. 3, p. 647- 654, 2015.
- SAMMOUR, T. et al. Warming and humidification have no effect on oxidative stress during pneumoperitoneum in rats. **Minimally Invasive Therapy**, v.20. p.329–337, 2011.
- VASCONCELOS, C. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v.30, n.5, p. 1323-1338, 2007.

VELLOSA, J. C. R. et al. Alterações metabólicas e inflamatórias em condições de estresse Oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v.34, n. 3, p. 305-312, 2013.

VOLZ, J. et al. Characteristic alterations of the peritoneum after carbon dioxide pneumoperitoneum. **Surgical Endoscopy**, v. 13, n. 6, p. 611-614, 1999.

YU, T. et al. Warm, humidified carbon dioxide gas insufflation for laparoscopic appendectomy in children - A double-blinded randomized controlled trial. **Annals of Surgery**, v. 257, n. 1, p. 44-53, 2013.