

Avaliação do número de alvéolos de pulmões remanescentes de ratos após lobectomia ou bilobectomia

Amélia Cristina Seidel*, Alvacir Santos Bahls, Hugo Meister, Dorival Moreschi Jr, Juliana Paula Bagatin e Lilian Yumi Nakayama

Departamento de Medicina, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo, 5790, 87020-900, Maringá-Paraná, Brazil. *Author for correspondence.

RESUMO. Realizou-se este estudo com objetivo de analisar a resposta adaptativa da ressecção pulmonar, tendo-se como parâmetro a histologia do parênquima pulmonar remanescente. Foram utilizados quarenta e cinco *Rattus norvegicus albinus*, Wistar, fêmeas, adultos. Distribuídos em grupo I, animais submetidos a lobectomia média direita, e redistribuídos em dois subgrupos para avaliação do pós-operatório aos 30 e 60 dias. No grupo II, os animais foram submetidos a bilobectomia cranial e média direita e também foram redistribuídos em subgrupos para posterior avaliação. Os animais que constituíram o grupo controle não sofreram intervenção cirúrgica. Os resultados mostraram que após a ressecção, ocorreu hiperplasia do parênquima pulmonar remanescente, além de dilatação dos espaços aéreos. Nos animais do grupo controle, o número de alvéolos foi sempre maior quando comparados aos animais submetidos à ressecção pulmonar.

Palavras-chave: lobectomia, ratos, alvéolos.

ABSTRACT. Evaluation of the number of alveoli of the remaining rat lungs after lobectomy or bilobectomy. The aim of this study was to analyze the lung resection adaptive response, using as a parameter the histology of the remaining pulmonary parenchyma. Forty-five adult female Wistar rats, *Rattus norvegicus albinus*, were used distributed into group I, II. The group I animals underwent a right-medium lobectomy, and were re-arranged in two subgroups for post-surgical evaluation after 30 and 60 days, respectively. The group II animals underwent both a cranial and a medium-right bilobectomy, being re-arranged in sub-groups for subsequent evaluation. The control group animals did not undergo any surgical procedure. The results showed that there was a hyperplasia of the remaining pulmonary parenchyma after resection, besides the dilation of the aerial spaces. The number of alveoli in the control group animals was always higher when compared to the animals that experienced pulmonary resection

Key words: lobectomy, rats, alveoli.

A resposta adaptativa à ressecção do tecido pulmonar tem sido objeto de numerosas investigações, que afirmam a ocorrência de um aumento do pulmão remanescente devido à simples dilatação dos alvéolos, análogo ao enfisema (Berger e Burri, 1985; Cataneo *et al.*, 1989; Nattie *et al.*, 1979) ou devido à hipertrofia (Addis, 1928; Berger e Burri, 1985; Brody e Buhain, 1973; Fisher e Simnett, 1973; Rannels *et al.*, 1979; Romanova *et al.*, 1967; Romanova e Zhikhareva, 1972; Tartter e Goss, 1973; Thet e Law, 1984; Wandel *et al.*, 1983; Watkins *et al.*, 1985) e hiperplasia (Burry e Sehovic, 1979; Cohn, 1939; Holmes e Thurlbeck, 1979; Nattie *et*

al., 1979; Watkins *et al.*, 1985). Isto é questão de interesse acadêmico e prático.

É objetivo do presente trabalho investigar a resposta adaptativa da ressecção pulmonar, visando analisar o número de alvéolos com 30 e 60 dias do pós-operatório, comparando os resultados obtidos nos animais submetidos à cirurgia com o grupo controle, não operado.

Material e métodos

Foram utilizados 45 *Rattus norvegicus albinus*, Wistar, fêmeas, adultos, pesando de 166 a 214 gramas, obtidas no Biotério Central da UEM. Após

o aleitamento, os animais foram transferidos e mantidos em biotério exclusivo para o desenvolvimento do experimento, em condições ambientais com iluminação natural e temperatura controlada de 23° Celsius, e alimentados com ração própria para raça e água à vontade.

Os animais foram distribuídos em 2 grupos: grupo I, com 18 animais submetidos à lobectomia média do pulmão direito e redistribuídos em subgrupos de 9 animais: IA - para avaliação aos 30 dias do pós-operatório, e IB - para avaliação aos 60 dias do pós-operatório. No grupo II, outros 18 animais foram submetidos à bilobectomia cranial e média direita e também redistribuídos em subgrupos para avaliação aos 30 e 60 dias do pós-operatório. No grupo controle, nove exemplares não sofreram intervenção cirúrgica.

Foram anestesiados com pentobarbital sódico (40 mg.kg⁻¹ de peso), por via intraperitoneal.

Após a anestesia, os animais foram submetidos à depilação do local a ser operado e colocados em ambiente (caixa de plástico com 41 x 33 x 17 cm) enriquecido com fluxo de oxigênio (1 l.min.⁻¹) durante 10 min.

Os animais foram colocados sobre uma goteira cirúrgica em decúbito lateral esquerdo com seus membros fixados. O procedimento operatório foi realizado com ventilação espontânea, sem intubação orotraqueal, com cateter de oxigênio (fluxo de 1 l.min.⁻¹) em uma campânula que envolvia a cabeça do animal.

A toracotomia lateral direita foi realizada através de uma incisão a nível do quarto espaço intercostal, os músculos da parede torácica foram seccionados e a cavidade pleural aberta para visualização do pulmão direito. Os lobos cranial (nos animais do grupo I), cranial e médio (nos animais do grupo II) foram sucessivamente pinçados, ligados em monobloco com fio de algodão 000 e resseccionados. Para manter-se a pressão intratorácica subatmosférica, foi realizada a aspiração da cavidade pleural com cateter de polietileno número 6 F, adaptado em uma seringa de 3 mililitros, durante o fechamento do intercosto. As camadas musculares e o tegumento foram suturados com pontos separados de fio de algodão 000. Após o procedimento cirúrgico, os animais foram mantidos no ambiente enriquecido com oxigênio por uma hora ou até a recuperação da anestesia.

Após 30 ou 60 dias, os animais foram novamente anestesiados conforme descrito anteriormente e colocados na goteira cirúrgica em decúbito dorsal com abdução e fixação de seus membros. Antecedendo a abertura da cavidade torácica, tiveram

a porção cervical da traquéia exposta e pinçada. Foi realizada uma laparotomia na região abdominal subcostal por uma incisão transversal. O músculo diafragma foi liberado da parede torácica, os arcos costais foram seccionados e a parede anterior do tórax retraída cranialmente para exposição das vísceras torácicas. Após a abertura do pericárdio, as veias cava inferior e superior foram ligadas próximo ao átrio direito. O átrio direito foi puncionado com escalpe número 25 para gotejamento de solução salina isotônica para lavagem, e em seguida, 20 ml de solução de formalina a 10 % por vinte minutos para fixação do tecido pulmonar, utilizando-se o batimento cardíaco para perfusão pulmonar.

Os pulmões pré-fixados foram retirados em bloco e os animais foram sacrificados por exsanguinação, quando da secção da artéria aorta e veia cava caudal junto do diafragma. Os blocos pulmonares receberam fixação complementar em solução de formaldeído a 10%.

Foram obtidos fragmentos dos pulmões dos diversos subgrupos, com amostras no mesmo nível, correspondendo a cortes transversais na transição dos terços médio e basal dos espécimes, conforme a descrição:

- subgrupos IA e IB: pulmões esquerdos, lobos craniais, acessórios e caudais dos pulmões direitos.
- subgrupos IIA e IIB: pulmões esquerdos, lobos caudais e acessórios dos pulmões direitos.
- grupo controle: pulmões esquerdos, lobos craniais, médios, acessórios e caudais dos pulmões direitos.

O material recebeu processamento histológico pela técnica convencional com desidratação em série crescente de etanol, diafanização em benzol, impregnação e inclusão em parafina.

Foram obtidos cortes seriados em micrótomo de parafina com 4 micrômetros de espessura. Os preparados foram corados pela hematoxilina e eosina, avaliados e fotografados, sempre em regiões subpleurais nas áreas sem artefatos e com distribuição homogênea dos alvéolos. Para análise microscópica e fotomicrografia utilizou-se microscópio com ocular de 7x e objetiva de 10x.

Calculou-se o número de alvéolos no material aplicando os parâmetros na equação de Delesse (1842), citado por Weibel e Gomez (1962) e Weibel, (1963), modificada por Rosival (1892), citado por Weibel e Gomez (1962) e Weibel (1963).

$$N = \frac{n^{3/2}}{\beta \sqrt{\rho}}$$

onde N = número de alvéolos
 n = número de transsecções
 β = coeficiente de configuração
 ρ = densidade volumétrica.

A partir da fotografia de uma lâmina micrométrica ZEISS, confeccionou-se um retículo em transparência de celulose, para delimitar uma área de 1 mm². Realizou-se a medição através da sobreposição desse retículo nas fotomicrografias.

Para determinação do número de transsecções alveolares (n) na área de secção, foram considerados todos os pontos de cruzamento das linhas do retículo com os septos alveolares nos diversos cortes. Foram utilizados aqueles das margens esquerda e superior e desprezados os marginais inferiores e da direita.

O coeficiente de configuração β, determinado por cálculos matemáticos, relaciona-se com a média da área de secção dos alvéolos. Tendo os alvéolos a forma de um poliedro, que pode ser aproximadamente circunscritos a uma esfera, o valor do coeficiente é considerado como constante e igual a 1,55.

A densidade volumétrica ρ foi calculada pelo método de integração linear descrito por Rosiwal (1892), citado por Weibel e Gomez (1962) e Weibel, (1963), utilizando-se outro retículo também confeccionado em transparência de celulose, mas com 14 linhas de distribuição horizontal e vertical aleatória, sobreposto nas fotomicrografias. Seu valor foi considerado como sendo o somatório das frações das linhas que interceptaram os alvéolos, calculado como segue:

Comprimento da linha = L = 1 mm

Número de alvéolos seccionados por mm: n'

Comprimento da linha nos alvéolos:

$$\sum_{l=1}^{n'} l_i = l_1 + l_2 + l_3 + \dots + l_n$$

Densidade linear: $\rho_l = \frac{\sum_{l=1}^{n'} l}{L} < 1$

$$l = \frac{\sum_{l=1}^{n'} l}{n'}$$

$0 < \rho_l < 1$

$\rho_l = 0$ não há alvéolos $\rho_l = \frac{\text{mm de alvéolos}}{\text{mm de amostra}}$

$\rho_l = 1$ só há alvéolos
 Rosiwal: $\rho_l = \rho_s = \rho_v$

Após obtenção do valor de N, foi realizado o seguinte cálculo, considerando-se o aumento real da película fotográfica: $M' = \frac{X \times M}{280}$

onde, X = comprimento do trajeto óptico da ocular até a película fotográfica (120 mm)
 M = aumento da objetivo x ocular (7 x 10)
 M' = aumento da película.

O valor encontrado de 33,6 foi multiplicado pelo valor de N para cálculo final do número de alvéolos.

Os resultados histomorfométricos receberam tratamento estatístico com aplicação do teste Análise de Variância, complementada pelo teste de Tukey (Quadro I).

1. Contraste entre duas médias, na operação e no mesmo tempo.
2. Contraste entre duas médias, no tempo e na mesma operação.

Quadro 1. Planejamento experimental considerado para aplicação do teste estatístico

Tempo (A)	Condição (B)	Operação (C)
30 dias	pré	lobectomia
		bilobectomia
		controle
	pós	lobectomia
		bilobectomia
		controle
60 dias	pré	lobectomia
		bilobectomia
		controle
	pós	lobectomia
		bilobectomia
		controle

Resultados

Analisando-se os dados histomorfométricos obtidos no decorrer do procedimento experimental, foram obtidos os resultados relatados abaixo.

No grupo controle, os cortes histológicos representativos dos diversos lobos dos pulmões direito e esquerdo demonstraram parênquima com alvéolos sem edema ou hemorragia, com septos íntegros, delgados, com capilares contendo poucas hemácias e com revestimento epitelial típico.

Na análise aos 30 dias do pós-operatório, no grupo I, os cortes histológicos dos pulmões direito e esquerdo não demonstraram significantes alterações alveolares em relação ao grupo controle, mantendo-se a arquitetura geral preservada. No grupo II, foi observado dilatação irregular e variável de alvéolos.

Na análise aos 60 dias do pós-operatório, no grupo I houve variação em relação ao controle, mostrando dilatação de ductos alveolares e distensão dos septos alveolares. Em dois casos, foi observado atelectasia com fibrose pleural e subpleural e infiltrado inflamatório. No grupo II, em alguns casos, houve falta de dilatação total dos alvéolos e, por conseqüência espessamento dos septos. Em um grupo de animais não houve significante mudança do quadro histológico em relação ao controle, e em 40 % dos casos foi caracterizado dilatação de ductos alveolares e alvéolos, à semelhança com os descritos anteriormente.

Pela avaliação estatística, verificou-se que o teste foi significativo ao nível de 5%, relacionando-se as médias na operação e no mesmo tempo. Foi verificado um maior número de alvéolos nos pulmões dos exemplares do grupo controle.

E não foi significativa a este nível na comparação no tempo e na mesma operação (Tabela I).

Tabela 1. Análise de Variância (número de alvéolos)

Fonte	Graus de liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado médio	F _{calculado}
A	1	2.9807E+09	2.9807E+09	2.85
Erro (a)	8	8.3463E+09	1.0432E+09	
B	2	4.7473E+11	2.7336E+11	255.28*
A*B	2	4.5078E+09	2.2539E+09	2.42
Erro (b)	32	2.9754E+10	9.2981E+08	
Total	53	5.3263E+11		

* significativo ao nível de 5%; F_{crítico} = 32

A = tempo
B = condição

Discussão

Existe na literatura considerável controvérsia entre os resultados dos trabalhos destinados a avaliar a resposta adaptativa à ressecção pulmonar.

Holmes e Thurlbeck (1979) realizaram ressecções pulmonares em ratos de diferentes idades e observaram aumento do número de alvéolos pulmonares em todas as idades, porém, mais significativo em animais jovens. Neste trabalho, para evitar o risco de erro devido a esta variável, foram utilizados animais adultos.

Cohn (1939), Burri e Schovic (1979), Wandel et al., (1983) descreveram o resultado da ressecção pulmonar como hiperplasia, onde a restauração celular envolveu uma resposta puramente

proliferativa das células, sendo que Rannels et al., (1979) acrescentaram que a velocidade de crescimento compensatório depende do índice basal da divisão das células pulmonares na época da operação.

Nas observações deste trabalho, os resultados histológicos mostraram que em ratos do grupo I, avaliados aos 30 dias do pós-operatório, não existiram significantes alterações alveolares em relação ao grupo controle; e no grupo II houve dilatação variável dos alvéolos. Com análise aos 60 dias do pós-operatório, existiram alterações nos dois grupos de animais operados em relação ao controle. Foi constatado um maior número de alvéolos nos pulmões dos animais do grupo controle se comparados com exemplares operados de qualquer grupo.

Com estes resultados, baseados na histomorfometria de pulmões de ratos após lobectomia ou bilobectomia, não se pretendeu elucidar efetivamente os questionamentos sobre o tema. Novas pesquisas desta natureza certamente devem ser realizadas para uma melhor compreensão das alterações morfológicas e funcionais resultantes da ressecção pulmonar e para melhor compreensão da adequação no tecido pulmonar remanescente.

Pôde-se concluir que no grupo de animais submetidos à ressecção pulmonar, o número de alvéolos é menor quando comparado aos animais do grupo controle. Ocorreu hiperplasia do parênquima pulmonar remanescente e dilatação dos espaços aéreos.

Referências bibliográficas

- Addis, T. Compensatory hypertrophy of the lung after unilateral pneumonectomy. *J. Exp. Med.*, 47:52-56, 1928.
- Berger, L.C.; Burri, P.H. Timing of the quantitative recovery in the regenerating rat lung. *Am. Rev. Res. Dis.*, 132:777-783, 1985.
- Brody, J.S.; Buhain, W.J. Hormonal influence on post-pneumonectomy lung growth in the rat. *Resp. Physiol.*, 19:344-355, 1973.
- Burri, P.H.; Schovic, S. The adaptive response of the rat lung after bilobectomy. *Am. Rev. Res. Dis.*, 119:768-777, 1979.
- Cataneo, A.J.M.; Curri, P.R.; Reibschid, S.M. Alterações funcionais do aparelho respiratório pós-trilobectomia pulmonar. Estudo experimental no rato. *J. Pneumol.*, 15:1-7, 1989.
- Cohn, R. Factors affecting the postnatal growth of the lung. *Anat. Rec.*, 75:195-205, 1939.

- Fisher, J.M.; Simnett, J.D. Morphogenetic and proliferative changes in the regenerating lung of the rat. *Anat. Rec.*, 176:389-395, 1973.
- Holmes, C.; Thurlbeck, W.M. Normal lung growth and response after pneumonectomy in rats at various ages. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 120:1125-1136, 1979.
- Nattie, E.E.; Wiley, C.W.; Bartlett, D.Jr. Adaptive growth of the lung following pneumonectomy in rats. *J. Appl. Physiol.*, 37:461-465, 1979.
- Rannels, D.E.; White, D.M.; Watkins, C.A. Rapidity of compensatory lung growth following pneumonectomy in adult rats. *J. Appl. Physiol.*, 46:326-333, 1979.
- Romanova, L.K.; Leikina, E.M.; Antipova, K.K. Nucleic acid synthesis and mitotic activity during development of compensatory hypertrophy of the lung in rats. *Bull. Exper. Biol. Med.*, 63:303-306, 1967.
- Romanova, L.K.; Zhikhareva, I.A. Humoral regulation of regeneration in the lungs, kidneys and liver. *Bull. Exper. Biol. Med.*, 73:84-87, 1972.
- Tartter, P.I.; Goss, R.J. Compensatory pulmonary hypertrophy after incapacitation of one lung in the rat. *J. Thor. Cardiovasc. Surg.*, 66:47-52, 1973.
- Thet, L.A.; Law, J.L. Changes in cell number and lung morphology during early postpneumonectomy lung growth. *J. Appl. Physiol.*, 56:975-978, 1984.
- Wandel, G.; Berger, L.C.; Burri, P.H. Morphometric analysis of adult rat lung after bilobectomy. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 128: 968-972, 1983.
- Watkins, C.A.; Burkhart, L.R.; Rannels, D.E. Lung growth in response to unilateral pneumonectomy in rapidly growing rats. *Am. J. Physiol.*, 248:162-169, 1985.
- Weibel, E.R.; Gomez, D.M. A principle for counting tissue structure on random sections. *J. Appl. Physiol.*, 17:343-348, 1962.
- Weibel, E.R. Principles and methods for the morphometric study of the lung and other organs. *Lab. Invest.*, 12:131-155, 1963.

Received on October 15, 1999.

Accepted on May 26, 2000.