

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

GUILHERME ECKERT PETERSON

TITULO

**DOSAGEM DE FRAÇÕES ATIVADAS DO SISTEMA COMPLEMENTO EM
EMPIEMA INDUZIDO EM RATOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre
2016.

GUILHERME ECKERT PETERSON

**DOSAGEM DE FRAÇÕES ATIVADAS DO SISTEMA COMPLEMENTO EM
EMPIEMA INDUZIDO EM RATOS**

Dissertação de Mestrado

Orientador: José Carlos Soares de Fraga

Porto Alegre, Brasil 2016.

CIP - Catalogação na Publicação

Peterson, Guilherme Eckert Dosagem de Frações
Ativadas do Sistema Complemento em Empiema Induzido
em Ratos / Guilherme Eckert Peterson. -- 2016.
60 f.

Orientador: José Carlos Soares Fraga.
Coorientador: Sérgio Luís Amantea.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas,
Porto Alegre, BR-RS, 2016.

1. Empiema Pleural. 2. Modelos animais. 3.
Proteínas do Sistema Complemento. 4. Ativação do
Complemento. 5. Anafilatoxinas. I. Fraga, José
Carlos Soares, orient. II. Amantea, Sérgio Luís,
coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com
os dados fornecidos pel(a) autor(a).

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Carlos Alberto e Jeanine por serem exemplos de empenho e de vida. A minha parceira de vida Ana Paula, que esteve sempre presente no empreendimento deste trabalho.

Agradeço ao meu orientador José Carlos Soares de Fraga, pela paciência e força na confecção e revisões deste trabalho; assim como meu coorientador Sérgio Luís Amantea.

Agradeço a minha colega Samanta, com quem dividi boa parte do trabalho intelectual e braçal nos nossos estudos.

Agradeço a equipe da UEA, Marta J. Giotti Cioato e às veterinárias Fabíola Schons Meyer e Tuane Nerissa Alves Garcez que deram um grande suporte técnico e espiritual para o manejo dos nossos pequenos sujeitos de pesquisa.

Agradeço a aluna do curso de medicina Patricia Miorelli, que esteve sempre ao nosso lado quando precisávamos.

Agradeço às biólogas Fernanda Pereira e Patrícia Khoeler que pacientemente ensinaram dois cirurgiões o árduo trabalho laboratorial que foi necessário para a realização deste trabalho.

Agradeço a agora doutora Eliane Roesch, que nos forneceu além de bactérias e culturas um grande apoio para a realização do trabalho.

Agradeço à Profa. Dra. Jane Kulczynski, que nos emprestou seu tempo em finais de semana para a avaliação histopatológica.

Ao grande amigo doutor Maicon Falavigna, que dividiu seu conhecimento em estatística durante horas de folga.

Sumário:

I. Lista de abreviaturas.....	6
II. Lista de figuras.....	7
III. Lista de tabelas	8
IV Lista de figuras em inglês.....	9
V. Lista de tabelas em inglês	10
1. Introdução.....	12
2. Revisão da literatura	12
2.1 Fases do empiema pleural.....	12
2.2 Critérios bioquímicos	13
2.3 O Sistema Complemento	13
2.4 Modelos experimentais.....	14
3. Referências da Revisão da Literatura	15
4. Objetivos.....	18
4.1 Objetivo Geral	18
4.2 Objetivos Específicos	18
5. Artigo original em português.....	20
5.1 Resumo	22
5.2 Abstract.....	24
5.3 Introdução.....	26
5.4 Material e métodos	26
5.5 Resultados.....	28
5.6 Discussão	31
5.7 Referências	33
5.8 Lista de Tabelas	37

5.9 Lista de Figuras	38
6. Artigo original em inglês	39
6.1 Abstract.....	42
6.2 Introduction	44
6.3 Methods	45
6.4 Results	46
6.5 Discussion.....	49
6.6 References	52
6.7 List of tables	56
6.8 List of figures.....	57
7. Considerações finais	58
8. Anexos.....	59

I . LISTA DE ABREVIATURAS

ELISA.....	enzyme-linked immunosorbent assays
BHI	Caldo cérebro-coração
C3a.....	Fração do complemento C3a
C5a.....	Fração do complemento C5a
C5b9.....	Fração do Complemento C5b9
GP	grupo
IC	Intervalo de confiança
Kg	kilograma
mg.....	miligrama
pg	picograma
µg.....	micrograma
ROC.....	<i>Reciever Operator Curve</i>
SA.....	<i>Staphylococcus Aureus</i>
SP.....	<i>Streptococcus Pneumoniae</i>

II. LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Curva ROC das frações ativadas do complemento..... pág 32

Figura 2 - Curva ROC marcadores tradicionais pag 32

III. LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Bioquímica do líquido pleural 12 h após a inoculação de bactérias ou terebentina (controle).	pag 30
Tabela 2 – Concentrações do Complemento no líquido pleural 12 h após a inoculação de bactérias ou terebentina (controle).....	pag 31
Tabela 3 - Avaliação histopatológica	pág 33

IV. LISTA DE FIGURAS EM INGLÊS

- Figure 1 - Specificity and sensitivity of protein and glucose to detect infected pleural effusion
in a rat model.....p. 52
- Figure 2. Specificity and sensitivity of complement activation products to detect infected
pleural effusion in a rat model. p 52

V. LISTA DE TABELAS EM INGLÊS

Table 1 – Biochemical analysis of pleural fluid 12 h after injection of bacteria or turpentine (control)	p. 50
Table 2 – Levels of complement activation products in pleural fluid 12 h after injection of bacteria or turpentine (control).....	p. 51
Table 3 – Pathology analysis of infected pleural effusion in a rat model	p. 53

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Empiema pleural (EP) é definido como a presença de secreção purulenta no espaço pleural, e é usualmente secundário à pneumonia com derrame pleural (derrame parapneumônico) (1,2). A mortalidade associada ao empiema é variável, sendo considerada de 8% em séries antigas (3,4), entretanto essa taxa não é observada atualmente (1,5). Tem-se evidenciado em diversas series que vem ocorrendo um aumento na incidência de derrame parapneumonico (1,6–9).

O empiema apresenta uma evolução com fases características, com piora do prognóstico quanto mais tardio for o inicio da terapia (10), desta forma torna-se essencial, para a redução da morbidade, o diagnóstico precoce e pronta definição da terapia adequada. (1,11-16)

Alem dos marcadores bioquímicos tradicionais, como glicose, proteína e LDH (2, 17), diversos marcadores vêm sendo estudados para o diagnóstico da infecção do derrame pleural (18-19), dentre eles as frações ativadas do sistema complemento. O objetivo do presente estudo foi utilizar um modelo animal consolidado, de fácil reprodução e de baixo custo para definir a concentração das frações ativadas C3a,C5a e C5b9 em grupos com derrame de duas espécies de bactérias e de um irritante químico (utilizado com o controle), para avaliar sua utilidade para detectar a infecção em derrame pleural de ratos.

2. REVISÃO DA LITERATA

2.1 Fases do empiema pleural

Desde a década de 1960, o empiema é dividido em 3 fases distintas, cada uma delas com uma recomendação de tratamento diferente (10). Na fase I (exsudativa) o derrame é fluído, não purulento, com alterações bioquímicas (lactato desidrogenase-LDH, pH e glicose), ou com identificação de germes por coloração de Gram ou crescimento em cultura. Nesta fase o derrame também é conhecido por derrame pleural complicado (DPC), diferenciado do derrame parapneumônico não complicado (DPNC) pela presença de infecção. O tratamento do derrame na fase I é realizado por adequada drenagem da cavidade pleural e antibioticoterapia (2,11). A falta de tratamento do derrame neste momento permite a progressão para a fase II (fibrinopurulenta), em que ocorre formação de

fibrina e de aderências pleurais, com conseqüente loculação do derrame. Neste momento, a drenagem torácica simples torna-se um método de tratamento ineficaz, necessitando a liberação e ruptura das aderências por meio de videotoroscopia, ou de uso intratorácico de fibrinolíticos (1,2,12,13). Se continuar sem tratamento, o empiema progride para a fase III ou organizada, na qual há surgimento de fibroblastos naquela malha de fibrina, formando uma membrana espessa inelástica ("peel" pleural), que ocasiona o encarceramento do pulmão com prejuízo da complacência pulmonar e piora da mecânica ventilatória. Nesta fase não basta apenas a drenagem ou limpeza da cavidade pleural, mas tratamentos mais agressivos com toracotomia com decorticação ou pleurostomia (14–16).

A progressão do empiema traz consigo não apenas uma maior complexidade no tratamento com maior morbidade, mas também um aumento no tempo de internação, assim como de custos hospitalares (6,7).

2.2 Critérios Bioquímicos

Tendo em vista o aumento da morbidade entre as diferentes fases do empiema, nota-se que a pronta identificação do DPC é fundamental para a resolução com a menor risco ao paciente. Os critérios bioquímicos classicamente usados para diferenciar o derrame parapneumônico complicado (DPC) do não complicado (DPNC) são a presença nos primeiros de pH menor que 7,0 , LDH maior que 1000 un/l ou glicose menor que 40 mg/dl(2,17,18). Entretanto, estes critérios são criticados por falta de trabalho prospectivo mostrando que são realmente efetivos na idade pediátrica.

Diversos novos marcadores estão sendo avaliados em séries clínicas baseando-se em dosagem de citocinas inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa, interleucina-8, enzimas liberadas pelas células de defesa do organismo como mieloperoxidase, matrizes metaloproteinases-2, 9 e 8, elastase do neutrófilo, proteína ligadora de lipopolissacarídeo, receptor solúvel expresso em célula mieloide, proteína C reativa além de fragmentos do complemento, como o complexo SC5b-9(18,19).

2.3 O Sistema Complemento

O sistema complemento, um participante fundamental na imunidade e na inflamação, é um dos componentes do sistema imune inato. Consiste em uma rota de enzimas e proteínas ativadas que participam na defesa do organismo, sendo relacionada em diversos distúrbios inflamatórios como sepse, nefropatias autoimunes e artrites. Sua principal função

é o reconhecimento de células estranhas ao organismo (bactérias, células infectadas por vírus ou células tumorais) e ativação da lise celular (20–22).

Existem três vias principais de ativação do complemento e uma quarta, comum: a via clássica, que é iniciada por imunocomplexos antígeno/anticorpo; a via da lectina de ligação a manose, iniciada por contato com microorganismos com esse sacarídeo em sua parede celular; a via alternativa iniciada por bactérias, fungos, vírus e células tumorais. Por fim a via terminal (comum às três anteriores), que leva a formação do complexo de ataque a membrana (MAC - "*membrane attack complex*") que induz a lise celular. Participam da rota terminal os componentes C3, C3b, C5, C6, C7, C8 e C9(20–22).

Como participam do reconhecimento de microrganismos patogênicos, vários estudos sugeriram a hipótese de que a concentração dos elementos ativados da rota terminal do complemento estaria aumentada no DPC (18,23).

A dificuldade em testar esses marcadores em séries clínicas está na variabilidade dos pacientes e nas dificuldades em arrolar um número adequado de pacientes, a fim de analisar os achados. Uma alternativa seria o estudo destes complementos em modelos experimentais de empiema. As dosagens dos componentes do complemento devem ser feitas com testes específicos para a espécie animal estudada, pois muitos apresentam baixa reação cruzada entre espécies. (24)

2.4 Modelos experimentais

Vários modelos experimentais de derrame pleural e empiema foram descritos na literatura. O animal mais estudado é o coelho (25,26), entretanto sua aquisição e manejo o torna um modelo difícil e oneroso. O método descrito pela inoculação de bactérias (*Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumonia*) por toracocentese em ratos, descrito por Fraga et al. se mostrou reprodutível e eficiente na produção de empiema (27).

A terebintina, um óleo derivado de árvores, é utilizada em alguns modelos experimentais como indutor de inflamação estéril (28,29), seja para formação de abscessos, para indução de estado pró inflamatório e para a indução de derrame pleural(30). O uso da terebintina para indução de derrame pleural estéril em coelhos foi descrita a dose de 0,5 a 1ml (31,32), e em ratos de 0,1 ml (33). Esse produto é constituído por três compostos orgânicos, o alfa (47%) e beta pineno (42%) e o dipenteno (6%). É um produto com toxicidade comprovada tanto para ingestão quanto para o contato cutâneo. A dose letal

mediana (LD50%), segundo a ficha de informações de segurança para produtos químicos (FISPQ), para contato cutâneo, em coelhos é para cada um dos componentes maior 5000mg/kg e para ingestão, em ratos, 3700mg/kg para o alfa pineno, maior que 5000 mg/kg para o beta pineno e 5300 mg/kg para o dipenteno.

3. REFERÊNCIAS DA REVISÃO DA LITERATURA

1. Schultz KD, Fan LL, Pinsky J, Ochoa L, Smith EO, Kaplan SL, et al. The changing face of pleural empyemas in children: epidemiology and management. *Pediatrics* [Internet]. 2004 Jun;113(6):1735–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15173499>
2. Thomas R, Lee YCG. Causes and management of common benign pleural effusions. *Thoracic surgery clinics* [Internet]. Elsevier Inc; 2013 Feb [cited 2013 Apr 12];23(1):25–42, v–vi. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23206715>
3. Chapman AA, Adejuyibe O, Taiwo O. Pleural empyema in infants and children: Analysis of 298 cases. *J Natl Med Assoc.* 1984;76:799–805.
4. Jess P, Brynitz S, Mollar A. Mortality in thoracic empyema. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg.* 1984;18:85–7.
5. Wang L-J, Mu S-C, Lin C-H, Lin M-I, Sung T-C. Fatal community-acquired pneumonia: 18 years in a medical center. *Pediatrics and neonatology* [Internet]. Elsevier Taiwan LLC; 2013 Feb [cited 2013 Apr 22];54(1):22–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23445739>
6. Burgos J, Falcó V, Pahissa A. The increasing incidence of empyema. *Current opinion in pulmonary medicine* [Internet]. 2013 Mar 14 [cited 2013 Apr 22];19(ahead of print). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23508113>
7. Wu P-S, Chang I-S, Tsai F-Y, Hsieh Y-C, Shao P-L, Chang L-Y, et al. Epidemiology and impacts of children hospitalized with pneumonia from 1997 to 2004 in Taiwan. *Pediatric pulmonology* [Internet]. 2009 Feb [cited 2013 Apr 22];44(2):162–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19142891>
8. J PID, Infect L. Etiology of empyema thoracis and parapneumonic pleural effusion in taiwanese children and adolescents younger than 18 years of age. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* 2013;32(4):419–21.
9. Hernández-Bou S, García-García JJ, Esteva C, Gené A, Luaces C, Muñoz Almagro C. Pediatric parapneumonic pleural effusion: epidemiology, clinical characteristics, and microbiological diagnosis. *Pediatric pulmonology* [Internet]. 2009 Dec [cited 2013 Apr 20];44(12):1192–200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19911359>
10. American Thoracic Society. Management of non-tuberculous empyema. *Am Rev Respir Dis.* 1962;85:935–6.
11. Quinn T, Alam N, Aminazad A, Marshall MB, Choong CKC. Decision making and algorithm for the management of pleural effusions. *Thoracic surgery clinics* [Internet]. 2013 Feb [cited 2013 Apr 22];23(1):11–6, v. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23206713>

12. Avansino JR, Goldman B, Sawin RS, Flum DR. Primary operative versus nonoperative therapy for pediatric empyema: a meta-analysis. *Pediatrics* [Internet]. 2005 Jun [cited 2013 Apr 1];115(6):1652–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15930229>
13. St Peter SD, Tsao K, Spilde TL, Keckler SJ, Harrison C, Jackson MA, et al. Thoracoscopic decortication vs tube thoracostomy with fibrinolysis for empyema in children: a prospective, randomized trial. *Journal of pediatric surgery* [Internet]. Elsevier Inc.; 2009 Jan [cited 2013 Apr 22];44(1):106–11; discussion 111. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3086274&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
14. Fraga JC, Kim P. Abordagem cirúrgica da efusão pleural parapneumônica e suas complicações Surgical treatment of parapneumonic pleural effusion and its complications. *Jornal de Pediatria*. 2002;78(Sup 2):161–70.
15. Rathinam S, Waller D a. Pleurectomy decortication in the treatment of the “trapped lung” in benign and malignant pleural effusions. *Thoracic surgery clinics* [Internet]. Elsevier Inc; 2013 Feb [cited 2013 Apr 22];23(1):51–61, vi. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23206717>
16. Bhatnagar R, Maskell N a. Treatment of complicated pleural effusions in 2013. *Clinics in chest medicine* [Internet]. Elsevier Inc; 2013 Mar [cited 2013 Apr 2];34(1):47–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23411056>
17. Light RW. Pleural effusions. *The Medical clinics of North America* [Internet]. Elsevier Inc; 2011 Nov [cited 2013 Mar 23];95(6):1055–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22032427>
18. Porcel JM. Pleural fluid tests to identify complicated parapneumonic effusions. *Current Opinion in Pulmonary Medicine* [Internet]. 2010 Jul [cited 2013 Apr 13];16(4):357–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20224408>
19. Porcel JM, Vives M, Esquerda A. Tumor necrosis factor-alfa in pleural fluid. *Chest*. 2004;125(1):160–4.
20. Ricklin D, Hajishengallis G, Yang K, Lambris JD. Complement: a key system for immune surveillance and homeostasis. *Nature immunology* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010 Sep [cited 2013 Feb 28];11(9):785–97. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2924908&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
21. Ricklin D, Lambris JD. Complement in Immune and Inflammatory Disorders: Pathophysiological Mechanisms. *The Journal of Immunology* [Internet]. 2013 Apr 5 [cited 2013 Apr 5];190(8):3831–8. Available from: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1203487>
22. Yan C, Gao H. New insights for C5a and C5a receptors in sepsis. *Frontiers in immunology* [Internet]. 2012 Jan [cited 2013 Mar 3];3(December):368. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3518060&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
23. Vives M, Porcel J, Gázquez I, Pérez B, Rubio M. Pleural SC5b-9: a test for identifying complicated parapneumonic effusions. *Respiration* [Internet]. 2000 [cited 2013 Apr 22];67:433–8. Available from: <http://www.karger.com/Article/FullText/29543>

24. Kirschfink M, Mollnes T. Modern complement analysis. *Clinical and diagnostic laboratory ...* [Internet]. 2003 [cited 2013 Apr 22];10(6):982–9. Available from: <http://cvi.asm.org/content/10/6/982.short>
25. Sasse S a, Jadus MR, Kukes GD. Pleural fluid transforming growth factor-beta1 correlates with pleural fibrosis in experimental empyema. *American journal of respiratory and critical care medicine* [Internet]. 2003 Sep 15 [cited 2013 Apr 17];168(6):700–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12963580>
26. Mulligan ME, Light RW, Sasse SA, Liza A. laboratory and animal investigations Serial Pleural Fluid Analysis in a New Experimental Model of Empyema *. 2013;1043–8.
27. Fraga JC, Amantéa SL, Argenta R, Moura L, Nhuch C, Borowski S. Indução de empiema em ratos através da inoculação pleural de bactérias Experimental empyema in rats through intrapleural injection of bacteria. 2001;77:469–74.
28. Ahmad G, Sial GZK, Ramadori P, Dudas J, Batusic DS, Ramadori G. Changes of hepatic lactoferrin gene expression in two mouse models of the acute phase reaction. *The international journal of biochemistry & cell biology* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011 Dec [cited 2013 Apr 19];43(12):1822–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21963450>
29. Jinbo T, Sakamoto T, Yamamoto S. Serum alpha2-macroglobulin and cytokine measurements in an acute inflammation model in rats. *Laboratory animals* [Internet]. 2002 Apr;36(2):153–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11943079>
30. Paulson WD, Hearsh-Holmes M, Stogner SW, Campbell GD, Kirk K a, George RB. Anion gap in turpentine-induced pleural effusions. Correlation with pH and protein level. *Chest* [Internet]. 1996 Feb;109(2):504–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8620729>
31. Shohet I, Yellin a, Meyerovitch J, Rubinstein E. Pharmacokinetics and therapeutic efficacy of gentamicin in an experimental pleural empyema rabbit model. *Antimicrobial agents and chemotherapy* [Internet]. 1987 Jul;31(7):982–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=174856&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
32. Liapakis IE, Light RW, Pitiakoudis MS, Karayiannakis a J, Giamarellos-Bourboulis EJ, Ismailos G, et al. Penetration of clarithromycin in experimental pleural empyema model fluid. *Respiration; international review of thoracic diseases* [Internet]. 2005 [cited 2013 Apr 26];72(3):296–300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15942299>
33. Ham KN, Hurley J V. Acute inflammation: An electron-microscope study of turpentine-induced pleurisy in the rat. *The Journal of Pathology and Bacteriology*. 1965;90(2):365–77.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Objetivo geral

- Avaliar a média e variância das dosagens de complemento em empiema induzido por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* e no líquido pleural estéril induzido pela colocação da terebentina intrapleural.

Objetivo Secundário

- Comparar a concentração da fração ativada do complemento em modelo experimental de empiema induzido por *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* com a concentração verificada no líquido pleural estéril induzido pela colocação da terebentina intrapleural.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir o uso de frações ativadas do complemento como marcadores de infecção em derrames pleurais.

- Relatar o uso de ecografia torácica para identificar e caracterizar derrame pleural em ratos, bem como orientar a toracocentese.

- Avaliar o uso da terebentina como indutor de derrame pleural estéril, servindo como modelo de derrame pleural não infectado e sendo utilizado como controle.

5. ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGÊS

DOSAGEM DE FRAÇÕES ATIVADAS DO SISTEMA COMPLEMENTO EM EMPIEMA INDUZIDO EM RATOS

Guilherme E Peterson¹, Samanta S Silva², Sérgio L Amantéa³,
Patrícia Miorelli⁴, Jane Kulczynski⁵, Eliane Roesch⁶, José Carlos Fraga⁷

Setor de Cirurgia Torácica Infantil/Serviço de Cirurgia Pediátrica e Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Guilherme Eckert Peterson

¹Cirurgião Pediátrico do Hospital Fêmeina, Grupo Hospitalar Conceição, e do Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS. Aluno de Mestrado do PPG: Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Samanta Sarmento da Silva

² Cirurgiã Pediátrica do Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS. Aluna de Mestrado do PPG: Ciências Cirúrgicas, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Sérgio Luís Amantéa

³ Professor Adjunto do Departamento de Pediatria da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Pneumologista Pediátrico Chefe da Emergência do Hospital Santo Antônio de Porto Alegre, Brasil.

Patrícia Miorelli

⁴ Aluna do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da UFRGS. Bolsista de Iniciação Científica PIBIC, Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Jane Kulczynski

⁵ Professora Adjunta do Departamento de Patologia da UFRGS. Patologista Chefe do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

Eliane Roesch

⁶ Farmacêutica Bioquímica da Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular do Serviço de Patologia Clínica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brasil.

Jose Carlos Fraga

⁷ Professor Titular do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Cirurgião Pediátrico do Setor de Cirurgia Torácica Infantil e Chefe do Serviço de Cirurgia Pediátrica, Hospital de Clínicas (HCPA) de Porto Alegre, RS, Brasil.

Resumo:

Introdução: Empiema pleural em geral decorre de complicação de pneumonias e, se não identificado e tratado precocemente, pode ocasionar aumento morbidade ou mesmo mortalidade. A identificação de marcadores no líquido pleural de efusões parapneumônicas que mostrem a presença ou a evolução precoce para empiema tem significância clínica. Neste cenário, dosagens das concentrações de frações ativadas do complemento no líquido pleural podem ajudar no diagnóstico precoce do empiema.

Objetivos: Comparar as concentrações de frações ativadas do complemento (C3a, C5a e C5b9) em efusões pleurais induzidas em ratos por inoculação intrapleural de bactérias ou por irritante químico estéril (terebentina).

Métodos: Trinta e nove ratos Wistar machos, peso médio de 414g (290 a 546g), realizaram anestesia geral com isofluorano inalatório por máscara, e toracocentese no 4º espaço intercostal com abocath conectado a oscilômetro de pressão para confirmar posição intrapleural. Os animais foram divididos em 3 grupos: SA (n=17) - inoculação de *Staphylococcus aureus*; SP (n=12) - inoculação de *Streptococcus pneumoniae*; C (n=10) – inoculação de terebintina (efusão pleural estéril, controle). Doze horas após a inoculação intrapleural foi coletado líquido pleural por toracocentese, sob controle ecográfico, e realizadas dosagens de C3a, C5a e C5b9 pelo método ELISA.

Resultados: A dosagem de C3a foi de 1066,82 µg/ml (937,29 – 1196,35 µg/ml) no grupo SA, 1188,28 µg/ml (1095,65 – 1280,92 µg/ml) no SP, e de 679,13 µg/ml (601,29 – 756,98 µg/ml) no C (p<0,001). A dosagem de C5a foi de 55.727 ng/ml (41,22 – 70,23 ng/ml) no grupo SA, 520.107 ng/ml (278,92-761,3 ng/ml) no SP, e de

5.268 ng/ml (1,68 – 8,85 ng/ml) no C ($p < 0,001$). A dosagem de C5b9 foi de 15,02 ng/ml (13,1 – 16,94 ng/ml) no SA, de 16,63 ng/ml (14,37 – 18,9 ng/ml) no SP, e de 14,05 ng/ml (9,8 – 18,29 ng/ml) no C ($p = 0,692$). A avaliação das curvas ROC demonstrou área sob a curva de 0,987 (IC95% 0,953-1) para o C3a; 1 para C5a (1-1) e 0,757 (0,523-0,990).

Conclusões: As frações ativadas dos complementos C3a e C5a foram significativamente maiores nos empiemas induzidos experimentalmente por inoculação intrapleural de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae* do que com aquelas observadas após inoculação intrapleural de terebentina. A dosagem elevada destas frações ativadas do complemento foi útil para o diagnóstico do empiema pleural induzido em ratos.

Palavras chaves: empiema pleural, sistema complemento, estudo experimental

Keywords: pleural empyema, complement system, experimental study

SUMMARY

Background

Pleural empyema is a well-known complication of pneumonia. If treatment is delayed, empyema may increase morbidity and mortality in affected patients. Therefore, the identification of empyema biomarkers in parapneumonic pleural effusion is desirable. Previous research has suggested complement activation products as candidate empyema markers.

Objective

To compare the levels of complement activation products C3a, C5a, and C5b9 in pleural effusion induced by *Staphylococcus aureus* (SA), *Streptococcus pneumoniae* (SP), or turpentine (control).

Method

Thirty-nine male Wistar rats (mean weight 414g; 290-546g) were allocated as follows: 17 animals in the SA group, 12 in the SP group, and 10 in the control group. Bacteria or turpentine were injected into the pleural space. After 12h, intrapleural fluid was collected using ultrasound-guided thoracentesis. Levels of complement activation products were determined using ELISA kits.

Results

Two SA and 1 SP animals died before 12h. Mean levels were as follows: C3a: 1066.82 $\mu\text{g/mL}$ (937.29-1196.35 $\mu\text{g/mL}$) in SA, 1188.28 $\mu\text{g/mL}$ (1095.65-1280.92 $\mu\text{g/mL}$) in SP, and 679.13 $\mu\text{g/mL}$ (601.29-756.98 $\mu\text{g/mL}$) in controls ($p<0.001$); C5a: 55.727 ng/mL (41.22-70.23 ng/mL) in SA, 520.107 ng/mL (278.92-761.3 ng/mL) in SP, and 5.268 ng/mL (1.68-8.85 ng/mL) in controls ($p<0.001$); C5b9: 15.02 ng/mL (13.1-16.94 ng/mL) in SA, 16.63 ng/mL (14.37-18.9 ng/mL) in SP, and 14.05 ng/mL (9.8-18.29 ng/mL) in controls ($p=0.692$). ROC analysis revealed an area under the curve of 0.987 (95%CI: 0.953-1) for C3a; 1 (1-1) for C5a; and 0.757 for C5b9 (0.523-

0.990).

Conclusions

In the present rat model, complement activation fragments C3a and C5a accurately detected infected pleural effusion.

Introdução:

Empiema pleural (EP) é definido como a presença de secreção purulenta no espaço pleural, e ele é usualmente secundário à pneumonia (derrame parapneumônico)^{1,2}. Diversas séries têm mostrado aumento na incidência de empiema.^{1,3-6} Embora de baixa mortalidade, o empiema parapneumônico está associado a alta morbidade, especialmente nas fases mais avançadas da evolução da doença pleural. Portanto torna-se muito importante o diagnóstico e tratamento precoce desta condição^{7,8}.

Diversos marcadores estão sendo relatados como úteis para diagnóstico precoce de empiema⁹⁻¹¹. São séries clínicas com dosagem de várias citocinas inflamatórias, tais como fator de necrose tumoral alfa, interleucina-8, enzimas liberadas pelas células de defesa do organismo como mieloperoxidase, matrizes metaloproteinases-2, 9 e 8, elastase do neutrófilo, proteína ligada a lipopolissacarídeo, receptor solúvel expresso em célula mieloide, proteína C reativa, além de fragmentos do complemento, tais como o complexo SC5b-9⁹⁻¹¹. Mais recentemente, a dosagem de fragmentos do sistema complemento (C3a, C5a e C5b9) tem sido aplicada na avaliação de sinais inflamatórios.

Dificuldade de avaliar a real utilidade de tais marcadores decorre da falta de homogeneidade da doença devido a diferentes etiologias, faixas etárias e diferentes estágios de evolução, implicando na necessidade de maiores tamanhos de amostra. Uma alternativa para tornar viável esta investigação é a realização de estudos em modelos experimentais de empiema.¹²⁻¹⁵

O objetivo deste estudo foi de avaliar se há diferenças nas concentrações do sistema complemento no empiema induzido em ratos através da inoculação intrapleural de bactérias.

Material e Métodos:

Estudo experimental controlado realizado no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), e com aprovação do Comitê de Ética em pesquisa do HCPA (projeto N°130027).

Trinta e nove ratos machos da raça Wistar, com peso médio de 414g (290 a 546g), foram divididos em três grupos conforme o material intrapleural inoculado; grupo SA - 17 ratos receberam 0,1 ml de solução de 10^{10} unidades/ml *Staphylococcus aureus*; grupo SP - 12 ratos receberam 0,05 ml de solução de 10^{10} unidades/ml de *Streptococcus pneumoniae*; grupo C (controle) - 10 ratos receberam 0,2 ml de terebintina intrapleural. Os volumes utilizados foram baseados em experimento piloto que determinou o volume do inóculo suficiente para ocasionar a formação de derrame pleural mas que não provocasse a morte dos animais.

Após anestesia com Isoflurano® inalatório e administração de Tramadol® intraperitoneal na dose de 0,05 ml/100g, os animais de cada grupo foram posicionados em decúbito lateral esquerdo, submetidos a tricotomia do hemitórax direito e realizada antissepsia com clorexidine aquosa. A instilação de bactérias ou terebintina no espaço pleural foi realizada por meio de punção através de um abocath número 24 introduzido no 4^o espaço intercostal direito (Figura 1). O abocath estava conectado a oscilômetro para confirmação da posição intrapleural, sendo

injetado caldo de cultura contendo bactérias nos grupos SA e SP, bem como terebentina no grupo C ou controle. Após os procedimentos, os animais foram mantidos em observação e receberam nova dose de Tramadol® se necessário.

Após 12h, os animais foram novamente anestesiados com Isoflurano® inalatório e Tramadol® intraperitoneal para dor. Ecografia torácica, com transdutor 12-13MHz, confirmou a presença do derrame pleural, e orientou a toracocentese para retirada deste líquido intrapleural. O líquido coletado foi dividido em cotas iguais, e armazenados a -80°C, sendo posteriormente utilizado para medição das concentrações dos complementos usando os kits para o componente 3a (C3A - USCN LIFE SCIENCE), componente 5a (C5A - USCN LIFE SCIENCE) e complexo terminal do complemento (CB5B-9 - USCN LIFE SCIENCE), bem como de dosagem da concentração de proteína, glicose e LDH.

Vinte e quatro horas após a instilação do líquido intrapleural, os animais foram eutanasiados com dose letal de ketamina e xilasina, e a seguir foi realizada necropsia. Após toracofrenolaparotomia, foi coletado líquido pleural residual que foi encaminhado para cultura, e realizada retirada em bloco do coração e pulmão. Os órgãos removidos foram colocados em frasco com formol a 10%. Nos exames anatomopatológicos posteriores foram avaliadas alterações na pleura visceral e parietal, assim como lesões na vascularização e no parênquima pulmonar com uso de escore realizado por patologista cego para alocação.

Os dados foram armazenados Microsoft Excel (2013), e analisados no programa SPSS (versão 18.0.3). As variáveis contínuas foram descritas por média e desvio padrão, ou mediana e amplitude interquartílica, e as variáveis categóricas, por frequências absolutas e relativas. Para estudo estatístico foram usados os testes

ANOVA e a análise entre os grupos como teste diagnóstico, análise de curva ROC. Foi considerado significativo quando os valores de “p” foram menores ou igual a 0,05.

Resultados:

O volume médio de líquido coletado em cada punção foi de 1,2 ml, não tendo sido observada diferença estatística entre os grupos.

A coloração por GRAM e cultura mostraram *Staphylococcus aureus* em todos os animais do grupo SA, *Streptococcus pneumoniae* em todos os animais do grupo SP e não foram detectados germes nos animais do grupo C.

Ocorreram perdas antes de 12 horas em dois ratos do grupo SA, um atribuído a hemopneumotórax e outro devido a infecção; também houve perda antes de 24 horas em 3 ratos do grupo SA e 5 ratos do grupo SP. Não ocorreu nenhuma morte nos animais do grupo C; neste grupo, um rato não desenvolveu derrame pleural, provavelmente devido a instilação de terebintina no plano muscular.

As dosagens bioquímicas no líquido pleural podem ser observadas na Tabela 1. A quantidade de proteínas foi de 5,454 (IC 95% 5,190-5,717) no grupo SA, 6,00 (IC 95% 5,412-6,588) no SP e de 4,778 (IC 95% 4,445-5,11) no grupo controle. A dosagem de glicose foi de 106,36 (92,74 - 119,97) no grupo SA, 14,5 (0 - 44,06) no SP e 160,78 (138,97 - 182,59) no grupo controle. A dosagem de LDH foi de 8067,7 (5410,71 - 10724,72) no grupo SA, 4663,25 (2626,52 - 6699,98) no SP e 20709,11 (16993,86 - 24424,36) no grupo controle.

Tabela 1 -- Bioquímica do líquido pleural 12 h após a inoculação de bactérias ou terebentina (controle): média (IC95%).

	SA (n 15)	SP (n 11)	Controle (n 9)	p
Proteínas	5,454 (5,190-5,717)	6,00 (5,412-6,588)	4,778 (4,445-5,11)	P<0,001
Glicose	106,36 (92,74 - 119,97)	14,50 (0* - 44,06)	160,78 (138,97 - 182,59)	P<0,001
LDH	8067,71 (5410,71 - 10724,72)	4663,25 (2626,52 - 6699,98)	20709,11 (16993,86 - 24424,36)	P<0,001
1- Teste Post Hoc Dunnett T3 mostra diferença entre ControleXSA (p=0,015) e controleXSP (p<0,001), mas não entre SPXSA (P=0,197)				
2- Teste Post Hoc Dunnett T3 mostra diferença entre os três grupos analisados (P<0,001)				
3- Teste Post Hoc Dunnett T3 mostra diferença entre ControleXSA (p=0,015) e controleXSP (p<0,001), mas não entre SPXSA (P=0,098)				

As concentrações de complemento observadas no líquido pleural 12 h após a inoculação intrapleural podem ser observadas na Tabela 2. A quantidade de C3a foi de 1066,82 µg/ml (937,29 – 1196,35 µg/ml) no grupo SA, 1188,28 µg/ml (1095,65 – 1280,92 µg/ml) no grupo SP, e de 679,13 µg/ml (601,29 – 756,98 µg/ml) no grupo controle. Análise por ANOVA mostrou p<0,001, com teste post HOC de Dunnett mostrando diferença significativa entre o grupo controle e os grupos SA e SP (p<0,001). Apesar da concentração do C3a tenha sido significativamente maior nos animais com injeção intrapleural de bactéria do que nos animais usados como controle, não se observou diferença estatística entre os grupos inoculados com diferentes bactérias (p=0,22) (Tabela 2).

A dosagem de C5a foi de 55.73 ng/ml (41,22 – 70,23 ng/ml) no grupo AS, 520.11 ng/ml (278,92-761,3 ng/ml) no grupo SP e de 5.27 ng/ml (1,68 – 8,85 ng/ml) no grupo controle. Análise por ANOVA mostrou diferença estatística, com p<0,001. Realizada análise post-hoc que mostrou diferença entre os três grupos (Tabela 2).

A concentração de C5b9 foi de 15,02 ng/ml (13,1 – 16,94 ng/ml) no grupo SA, 16,63 ng/ml (14,37 – 18,9 ng/ml) no grupo SP e de 14,05 ng/ml (9,8 – 18,29 ng/ml) no grupo controle. Não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os grupos pelo teste de ANOVA ($p=0,358$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Concentrações do Complemento no líquido pleural 12 h após a inoculação de bactérias ou terebentina (controle): Média (IC95%)

	SA (n=15)	SP (n=11)	Controle (n=9)	P
C3a	1066,82 (937,29 – 1196,35)	1188,28 (1095,65 – 1280,92)	679,13 (601,29 – 756,98)	<0,001 ¹
C5a	55,73 (41,22 – 70,23)	520,11 (278,92-761,3)	5,27 (1,68 – 8,85)	<0,001 ²
C5b9	15,02 (13,1 – 16,94)	16,63 (14,37 – 18,90)	14,05 (9,8 – 18,29)	0,358
¹ teste Post-Hoc de Dunnett T3 mostra diferença entre o grupo controle e SA e controle e SP ($p<0,001$), mas não entre SA e SP ($p=0,22$).				
² teste Post-Hoc de Dunnett T3 mostra diferença entre os três grupos: SA x Controle $p<0,001$; SP x Controle $p=0,002$ e SA x SP $p=0,005$				

A análise de curva ROC tanto dos marcadores tradicionais quanto das frações do complemento ativado, considerando como casos ambas as exposições a bactérias (tabela 3), mostrou as áreas sob a curva da concentração de glicose e de proteína respectivamente de 0,921 e 0,891 enquanto o C5a e C3a e C5b9 foram de 1 e 0,987 e 0,757.

Figura 1 - Curva ROC das frações ativadas do complemento

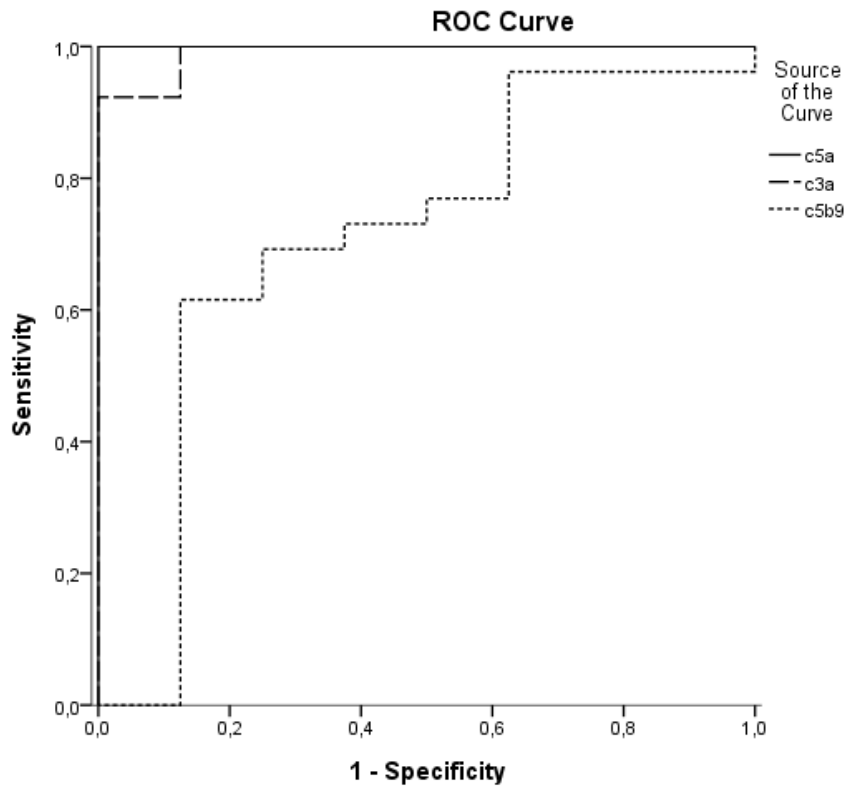
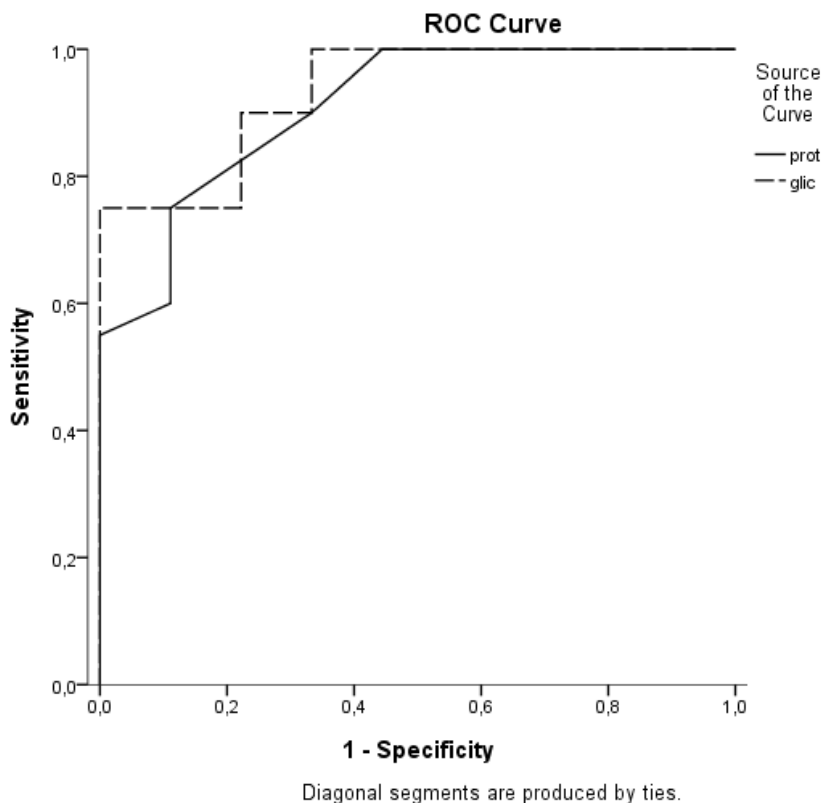


Figura 2 - Curva ROC marcadores tradicionais



Na população estudada, a utilização do ponto de corte da concentração de C5a de 13,604 levou a sensibilidade e especificidade próximas de 100%. Ao utilizar o ponto de corte da concentração de C3a de 740,15 obteve-se sensibilidade próxima de 100% e especificidade de 88%, enquanto o uso do ponto de corte de 824,87 mostrou sensibilidade de 92,3% e especificidade próxima a 100%.

A avaliação histopatológica apresentou distribuição não paramétrica e apresentou mediana e valores mínimos e máximos conforme a tabela 3. Realizado teste de Kruskal Wallis que demonstrou diferença entre o escore correspondente a infiltração de polimorfonucleares, necrose e hiperplasia mesotelial. Na avaliação entre os grupos, a diferença na infiltração de polimorfonucleares não foi significativa entre os grupos, sendo a significância entre o grupo SP e SA de 0,051 ($p=0,051$), SP

e controle de 0,154 e SP e SA de 1. A diferença no escore de necrose foi identificada entre o grupo SP e controle ($p=0,42$), mas não entre os demais (SA-SP $p=0,840$ e SA-Controle $p=0,351$). A diferença entre a hiperplasia mesotelial foi entre o grupo SA e Controle ($p=0,02$) e SP ($p=0,036$), mas não entre o grupo controle e SP ($p=1$).

Tabela 3 - Avaliação histopatológica

	Controle Mediana (min-máx)	SA Mediana (min-máx)	SP Mediana (min-máx)	p(Kruskal- Wallis)
Infiltrado PMN	3(0-3)	3(0-3)	4(1-4)	0,044
Infiltrado Linfoplasmocitario	0(0-3)	0(0-2)	0(0-0)	0,081
Necrose	1,5(0-2)	1(0-2)	0(0-2)	0,046
Fibrina	1(0-2)	0(0-3)	1(0-3)	0,126
Fibrose	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	1
Hemorragia	0(0-1)	0(0-1)	0(0-1)	0,962
Granulomas	0(0-0)	0(0-0)	0(0-0)	1
Hiperplasia Mesotelial	0(0-1)	1(0-2)	0(0-1)	0,008

Foi realizada comparação da concentração dos marcadores (c3a, c5a, proteína e glicose) entre os animais com óbito não programado (antes de 24 horas, mas com sobrevivida além de 12 horas), não sendo observado diferença estatística entre as médias dentro de cada grupo estudado.

Discussão:

As frações ativadas do complemento C3a e C5a foram capazes de discriminar a etiologia da resposta inflamatória no líquido pleural de animais expostos a bactérias comparados àqueles com inoculação intrapleural de irritante químico.

Diversos métodos têm sido usados para estudo do empiema de forma experimental, com utilização dos mais variados tipos de animais, como coelhos, porquinhos-da-índia e ratos^{13,16-23}. Nos primeiros estudos²³, o empiema era induzido por meio de toracotomia com necessidade de intubação e ventilação mecânica. Com a utilização do osciloscópio de pressão, foi possível a indução através da realização de punção pleural com maior segurança, tornando o procedimento mais simples, seguro e barato.

A experimentação com derrame pleural induzido em ratos já se mostrou eficaz para reproduzir derrame pleural infectado^{17,19}. Além disto, este modelo experimental pode avaliar testes diagnósticos com a grande vantagem de ter menor custo, tendo em vista os valores dos animais e de sua manutenção quando comparados ao uso de coelhos e porquinhos-da-Índia^{20,21,24-26}.

Apesar da utilização da terebintina como indutor de resposta inflamatória ser comum^{13-15,21,24,26-28}, este experimento é o primeiro que utiliza este irritante químico para provocar a formação de exsudato estéril intrapleural no rato, sem determinar alterações histopatológicas na pleura e pulmão, e permitindo a comparação deste líquido com aquele oriundo da infecção pleural por bactérias. Contudo, a inoculação de terebintina causou dor importante nos ratos, os quais mantinham postura antálgica na marcha e apresentavam taquipneia importante. Para manter o cuidado ético dos animais, foi incluído no manejo a administração de Tramadol®, com melhora importante da dor.

A utilização da ecografia permitiu não só a identificação de líquido pleural, mas também foi importante para orientação da toracocentese, sendo fundamental para coleta de mesmo pequenos volumes de líquido intrapleural.

A variabilidade do número de perdas dos animais nos estudos previamente publicados com ratos, quando descritos, foi de 22% a 35%. Desta forma, nosso experimento, com perdas de 25%, se manteve consistente à média dos demais estudos.

O estudo apresentou limitação da abordagem diagnóstica do derrame pleural, pois não foi possível realizar a dosagem de pH e contagem de células devido a pequena quantidade de derrame retirado na primeira coleta.

Este estudo experimental mostrou que a concentração de complementos C3a e C5a foram significativamente maiores nos empiemas induzidos experimentalmente após a inoculação intrapleural de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus Pneumoniae*, sugerindo que eles possam ser efetivos marcadores da presença de derrame parapneumônico com estas bactérias. Entretanto, o uso destes complementos como marcadores de derrames parapneumônicos infectados ainda necessita de estudos em humanos para validação de nossos resultados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Schultz KD, Fan LL, Pinsky J, Ochoa L, Smith EO, Kaplan SL, *et al.* The changing face of pleural empyemas in children: epidemiology and management. *Pediatrics* [Internet]. 2004 Jun; **113**: 1735–1740. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15173499>
- 2 Thomas R, Lee YCG. Causes and management of common benign pleural effusions. *Thorac Surg Clin* [Internet]. Elsevier Inc; 2013 Feb [cited 2013 Apr 12]; **23**: 25–42, v – vi. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23206715>
- 3 Burgos J, Falcó V, Pahissa A. The increasing incidence of empyema. *Curr Opin Pulm Med* [Internet]. 2013 Mar 14 [cited 2013 Apr 22]; **19**. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23508113>
- 4 Wu P-S, Chang I-S, Tsai F-Y, Hsieh Y-C, Shao P-L, Chang L-Y, *et al.* Epidemiology and impacts of children hospitalized with pneumonia from 1997 to 2004 in Taiwan. *Pediatr Pulmonol* [Internet]. 2009 Feb [cited 2013 Apr 22]; **44**: 162–166. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19142891>
- 5 Lin T, Hwang P, Liu C. Etiology of Empyema Thoracis and Parapneumonic Pleural Effusion in Taiwanese Children and Adolescents Younger Than 18 Years of Age. *Pediatr ...* [Internet]. 2013 [cited 2013 Apr 26]; **32**: 419–421. Available from: <http://europepmc.org/abstract/MED/23340566>
- 6 Hernández-Bou S, García-García JJ, Esteva C, Gené A, Luaces C, Muñoz Almagro C. Pediatric parapneumonic pleural effusion: epidemiology, clinical characteristics, and microbiological diagnosis. *Pediatr Pulmonol* [Internet]. 2009 Dec [cited 2013 Apr 20]; **44**: 1192–1200. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19911359>
- 7 Bhatnagar R, Maskell N a. Treatment of complicated pleural effusions in 2013. *Clin Chest Med* [Internet]. Elsevier Inc; 2013 Mar [cited 2013 Apr 2]; **34**: 47–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23411056>
- 8 Ahmed RA, Marrie TJ, Huang JQ. Thoracic Empyema in Patients with Community-Acquired Pneumonia. *Am J Med.* 2006; **119**: 877–883.
- 9 Vives M, Porcel J, Gázquez I, Pérez B, Rubio M. Pleural SC5b-9: a test for identifying complicated parapneumonic effusions. *Respiration* [Internet]. 2000 [cited 2013 Apr 22]; **67**: 433–438. Available from: <http://www.karger.com/Article/FullText/29543>
- 10 Porcel J. Pleural fluid tests to identify complicated parapneumonic effusions. *Curr Opin Pulm Med* [Internet]. 2010 Jul [cited 2013 Apr 26]; **16**: 357–361. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20224408>
- 11 Porcel JM, Vives M, Esquerda A. Tumor necrosis factor-alfa in pleural fluid. *Chest.* 2004; **125**: 160–164.
- 12 Fraga JC, Amantea S, Argenta R, Moura L, Nhuch C, Borowski S. [Experimental empyema in rats through intrapleural injection of bacteria]. *J Pediatr (Rio J)* [Internet]. 2001; **77**: 469–474. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=14647826

- 13 Sasse S. Serial pleural fluid analysis in a new experimental model of empyema. *CHEST ...* [Internet]. 1996 [cited 2013 Apr 26]; **109**: 1043–1048. Available from: <http://journal.publications.chestnet.org/article.aspx?articleid=1069622>
- 14 Ahmad G, Sial GZK, Ramadori P, Dudas J, Batusic DS, Ramadori G. Changes of hepatic lactoferrin gene expression in two mouse models of the acute phase reaction. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011 Dec [cited 2013 Apr 19]; **43**: 1822–1832. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21963450>
- 15 Paulson WD, Hearsh-Holmes M, Stogner SW, Campbell GD, Kirk K a, George RB. Anion gap in turpentine-induced pleural effusions. Correlation with pH and protein level. *Chest* [Internet]. 1996 Feb; **109**: 504–509. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8620729>
- 16 Mavroudis C, Ganzel BL, Cox SK, Polk HC. Experimental aerobic-anaerobic thoracic empyema in the guinea pig. *Ann Thorac Surg* [Internet]. 1987 Mar; **43**: 298–302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3548615>
- 17 Schopf LF, Fraga JC, Amantéa SL, Sanches P, Muller A, Borowski S, *et al.* Induction of pleural empyema in rats by thoracentesis with intrapleural pressure monitoring. *Pediatr Surg Int* [Internet]. 2004 Jul; **20**: 515–519. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15205903>
- 18 Sasse S a, Jadus MR, Kukes GD. Pleural fluid transforming growth factor-beta1 correlates with pleural fibrosis in experimental empyema. *Am J Respir Crit Care Med* [Internet]. 2003 Sep 15 [cited 2013 Apr 17]; **168**: 700–705. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12963580>
- 19 Martha VF, Fraga JC, Amantéa SL, Sanches P, Kulczynski J, Machado DP, *et al.* Tumor necrosis factor alpha in experimental empyema thoracis. *Pediatr Pulmonol* [Internet]. 2010 Dec; **45**: 1201–1204. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ppul.21308>
- 20 Kunz CR, Jadus MR, Kukes GD, Kramer F, Nguyen VN, Sasse S a. Intrapleural injection of transforming growth factor-beta antibody inhibits pleural fibrosis in empyema. *Chest*. 2004 Nov; **126**: 1636–1644.
- 21 Ham KN, Hurley J V. Acute inflammation: An electron-microscope study of turpentine-induced pleurisy in the rat. *J Pathol Bacteriol*. 1965; **90**: 365–377.
- 22 Genofre E, Vargas F. Indução de empiema em ratos através da inoculação pleural de bactérias; Experimental empyema in rats through intrapleural injection of bacteria. *J pediatr(Rio J)* [Internet]. 2001 [cited 2013 Apr 26]; **77**: 469–474. Available from: <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=314703&indexSearch=ID>
- 23 Tonietto T, Pilla ES, Madke GR, Silva ULe, Felicetti JC, Camargo JJP *et al.* Empiema pleural experimental em ratos : avaliação dos efeitos do uso intrapleural de dextran-40 na fase fibrinopurulenta *. *J Bras Pneumol*. 1999; **25**: 147–152.
- 24 Liapakis IE, Light RW, Pitiakoudis MS, Karayiannakis a J, Giamarellos-Bourboulis EJ, Ismailos G, *et al.* Penetration of clarithromycin in experimental pleural empyema model fluid. *Respiration* [Internet]. 2005 [cited 2013 Apr 26]; **72**: 296–300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15942299>
- 25 Allen SS, Cassone L, Lasco TM, McMurray DN. Effect of Neutralizing Transforming Growth

- Factor α_1 on the Immune Response against Mycobacterium tuberculosis in Guinea Pigs. *Infect Immun*. 2004; **72**: 1358–1363.
- 26 Strange C, Allen ML, Harley R, Lazarchick J, Sahn S a. Intrapleural streptokinase in experimental empyema. *Am Rev Respir Dis* [Internet]. 1993 Apr; **147**: 962–966. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8466134>
- 27 Shohet I, Yellin a, Meyerovitch J, Rubinstein E. Pharmacokinetics and therapeutic efficacy of gentamicin in an experimental pleural empyema rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 1987 Jul; **31**: 982–985. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=174856&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- 28 Jinbo T, Sakamoto T, Yamamoto S. Serum alpha2-macroglobulin and cytokine measurements in an acute inflammation model in rats. *Lab Anim* [Internet]. 2002 Apr; **36**: 153–157. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11943079>

5.8 LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Bioquímica do líquido pleural 12 h após a inoculação de bactérias ou terebentina (controle).	pag 30
Tabela 2 – Concentrações do Complemento no líquido pleural 12 h após a inoculação de bactérias ou terebentina (controle).....	pag 31
Tabela 3 - Avaliação histopatológica	pág 33

5.9 LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Curva ROC das frações ativadas do complemento..... pág 32

Figura 2 - Curva ROC marcadores tradicionais pag 32

6. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

ACCURACY OF COMPLEMENT ACTIVATION PRODUCT LEVELS TO

DETECT INFECTED PLEURAL EFFUSION IN RATS

Guilherme E Peterson¹, Samanta S Silva², Sérgio L Amantéa³, Patrícia Miorelli⁴, Paulo Sanches⁵, Jane Kulczynski⁶, Eliane Roesch⁷, José Carlos Fraga⁸

Division of Pediatric Thoracic Surgery/Service of Pediatric Surgery and Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Guilherme Eckert Peterson, MD

¹Hospital Fêmeina, Grupo Hospitalar Conceição, and Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS, Brazil; Graduate Program of Surgical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Samanta Sarmiento da Silva, MD

²Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, RS, Brazil; Graduate Program of Surgical Sciences, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Sérgio Luís Amantéa, MD, PhD

³Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Pediatric Pulmonologist. Hospital Santo Antônio de Porto Alegre, Brazil.

Patrícia Miorelli

⁴School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Paulo Sanches

⁵Doctor of Philosophy (Ph.D.), Biomedical/Medical Engineering, Hospital de Clínicas (HCPA) de Porto Alegre, RS, Brazil.

Jane Kulczynski

⁶Professor, Department of Pathology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).
Chief of Pathology, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil.

Eliane Roesch

⁷ Biochemist, Unit of Microbiology and Molecular Biology, Clinical Pathology Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil.

Jose Carlos Fraga

⁸Professor and Chairman in Pediatric Surgery, Department of Surgery, School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Chief of Pediatric Surgery Service, Hospital de Clínicas (HCPA) de Porto Alegre, RS, Brazil.

Acknowledgments

We are thankful to the Experimental Animal Unit at Hospital de Clínicas de Porto Alegre, and also to nurse Marta J. Giotti Cioato, veterinarians Fabíola Schons Meyer and Tuane Nerissa Alves Garcez, and biologists Fernanda Pereira and Patrícia Khoeler for their assistance with the experimental protocol.

Corresponding author:

Jose Carlos Fraga MD, MSc, PhD, FAAP

Professor and Chairman in Pediatric Surgery

Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Rua Ramiro Barcelos 2350, sala 600

Porto Alegre, Brazil, CEP 90035-903

e-mail: fraga.jcs@gmail.com

Grants and financial support: Financial support was provided by Fundação de Incentivo à Pesquisa (FIPE - project no. 130027), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

Keywords: pleural empyema, complement system, experimental study

Abbreviated title: Complement activation products in induced empyema

SUMMARY

Background

Pleural empyema is a well-known complication of pneumonia. If treatment is delayed, empyema may increase morbidity and mortality in affected patients. Therefore, the identification of empyema biomarkers in parapneumonic pleural effusion is desirable. Previous research has suggested complement activation products as candidate empyema markers.

Objective

To compare the levels of complement activation products C3a, C5a, and C5b9 in pleural effusion induced by *Staphylococcus aureus* (SA), *Streptococcus pneumoniae* (SP), or turpentine (control).

Method

Thirty-nine male Wistar rats (mean weight 414g; 290-546g) were allocated as follows: 17 animals in the SA group, 12 in the SP group, and 10 in the control group. Bacteria or turpentine were injected into the pleural space. After 12h, intrapleural fluid was collected using ultrasound-guided thoracentesis. Levels of complement activation products were determined using ELISA kits.

Results

Two SA and 1 SP animals died before 12h. Mean levels were as follows: C3a: 1066.82 µg/mL (937.29-1196.35 µg/mL) in SA, 1188.28 µg/mL (1095.65-1280.92 µg/mL) in SP, and 679.13 µg/mL (601.29-756.98 µg/mL) in controls (p<0.001); C5a: 55.727 ng/mL (41.22-70.23 ng/mL) in SA, 520.107 ng/mL (278.92-761.3 ng/mL) in SP, and 5.268 ng/mL (1.68-8.85 ng/mL) in controls (p<0.001); C5b9: 15.02 ng/mL (13.1-16.94 ng/mL) in SA, 16.63 ng/mL (14.37-18.9 ng/mL) in SP, and 14.05 ng/mL (9.8-18.29 ng/mL) in controls (p=0.692). ROC analysis revealed an area under the curve of 0.987 (95%CI: 0.953-1) for C3a; 1 (1-1) for C5a; and 0.757 for C5b9 (0.523-

0.990).

Conclusions

In the present rat model, complement activation fragments C3a and C5a accurately detected infected pleural effusion.

Introduction

Pleural empyema (PE) is defined as the presence of pus in the pleural space, usually secondary to pneumonia (parapneumonic effusion).^{1,2} An increase in the incidence of empyema has been noted worldwide.^{1,3-7} While heterogeneous empyema mortality rates have been reported in the literature, the associated morbidity is high, especially in more advanced stages of pleural disease. Therefore, early diagnosis and treatment of empyema are essential to limit damage.^{8,9}

Several biomarkers of empyema have been suggested¹⁰⁻¹²; case series studies have investigated the relationship between empyema and the levels of inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor- α and interleukin-8, antioxidant defense enzymes such as myeloperoxidase, matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-8, and MMP-9, neutrophil elastase, lipopolysaccharide-binding protein, soluble triggering receptor expressed on myeloid cell, C-reactive protein, and complement activation products such as SC5b-9.¹⁰⁻¹² Nevertheless, determining the usefulness of empyema biomarkers is complicated by the heterogeneity of the disease, which involves various possible etiologies, age groups, and disease stages. To produce clinically relevant results, very large samples would be required. Alternatively, the use of experimental models of empyema may be helpful to identify candidate biomarkers for investigation in human beings.¹³⁻¹⁶

Considering this scenario, the aim of this study was to investigate the accuracy of complement activation product levels to detect infected pleural effusion in a rat model of bacteria-induced empyema.

Materials and Methods

This controlled experimental study was carried out at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) Experimental Research Center following approval from the Institutional Review Board

(protocol 130027). All rats were obtained from the same commercial provider. Before the experiment, the animals were kept in isolation in boxes shared by not more than three individuals, with free access to water and chow in a 12h dark/light cycle. The handling of animals followed institutional and national guidelines.¹⁷

Thirty-nine male Wistar rats (mean weight 414g, 290-546g) were divided into three groups: 17 rats received an intrapleural injection of 0.1 mL *Staphylococcus aureus* solution (10^{10} colony forming units [CFU]/mL) (Group SA); 12 rats were injected with 0.05 mL *Streptococcus pneumoniae* solution (10^{10} CFU/mL) (Group SP); and 10 rats were injected with 0.2 mL turpentine (control group). These volumes were determined in a pilot study carried out to define the necessary amount of bacteria or turpentine to produce pleural effusion without killing the animals.

After mask induction of anesthesia with isoflurane and intraperitoneal administration of 0.05 mL/100g tramadol for pain control, animals were positioned in left lateral decubitus for removal of hair on the right hemithorax, followed by skin disinfection with chlorhexidine solution. Bacteria or turpentine were injected into the pleural space using a 24-gauge sheathed needle, which was inserted through the fourth right intercostal space. The position of the needle inside the pleural space was ascertained before injection of bacteria or turpentine using a pressure meter (oscillometer) connected to the needle. Following the procedure, the animals were monitored and a second dose of tramadol was administered if necessary.

After 12h the animals were again anesthetized with isoflurane and treated with intraperitoneal tramadol for pain control. Thoracic ultrasound (US) (12-13 MHz transducer) was performed to confirm the presence of pleural effusion and guide thoracentesis for intrapleural fluid collection. The collected fluid was divided into three equal aliquots and stored at -80°C for later determination of complement activation fragment levels using ELISA kits for complement component 3 (C3A - USCN LIFE SCIENCE- Cloud-Clone Corp. Houston/Texas), complement component 5a (C5A - USCN LIFE SCIENCE - Cloud-Clone Corp. Houston/Texas), and terminal complement complex CB5B-9 (USCN

LIFE SCIENCE - Cloud-Clone Corp. Houston/Texas). The ADVIA 1800 System (Siemens) was used for determination of glucose with the enzymatic ultraviolet test (hexokinase method), lactate dehydrogenase (LDH) with the kinetic ultraviolet method, and protein with the biurat test. Twenty-four hours after inoculation, the animals were euthanized with a lethal dose of ketamine/xylazine and submitted to necropsy. Following laparotomy and thoracotomy, the residual pleural fluid was collected for culture. Heart and lungs were excised en bloc and stored in individual tubes containing 10% formalin solution for analysis by a pathologist blinded to study groups. Pleural and lung specimens were scored according to the presence of abnormal vascularization and microscopic findings such as fibrosis, polymorphonuclear infiltrate, lymphocytic infiltrate, vasculitis, necrosis, or hemorrhage.

Data were entered into a Microsoft Excel (2013) spreadsheet and analyzed in SPSS (v. 18.0.3). Continuous variables were expressed as mean, standard deviation (SD) or median (interquartile range). Categorical variables were expressed as absolute and relative frequency. Analysis of variance (ANOVA) and Dunnett's post hoc test were used for comparisons between the groups. Receiver operating characteristic (ROC) analysis was used to determine the diagnostic accuracy of LDH, protein, glucose, C3a, C5a, and C5b-9 to detect empyema. Significance was established at 5% ($p < 0.05$).

Results

The mean volume of pleural fluid obtained by thoracentesis was 1.2 mL, without statistical difference between the groups. Culture revealed *Staphylococcus aureus* in all SA animals and *Streptococcus pneumoniae* in all SP animals. Bacteria were not detected in control animals.

Two SA (n=17) animals and one SP (n=12) animal died before 12h and were excluded from the analysis. The deaths were due to hemopneumothorax and infection (SA) or infection (SP). Therefore, 15 and 11 SA and SP animals respectively were studied. Also, three SA animals and five SP animals died before 24 h. There were no deaths in the control group (n=10), but one control animal

did not develop pleural fluid. The levels of protein, glucose, and LDH in pleural fluid 12 h after injection of bacteria or turpentine are described in Table 1.

Table 2 – Biochemical analysis of pleural fluid 12 h after injection of bacteria or turpentine (control)

	SA (n = 15)	SP (n = 11)	Control (n = 9)	p
	Mean (95%CI)	Mean (95%CI)	Mean (95%CI)	
Protein (mg/dl)	5.454 (5.190 - 5.717)	6.00 (5.412 - 6.588)	4.778 (4.445 - 5.11)	<0.001 ¹
Glucose (mg/dl)	106.36 (92.74 - 119.97)	14.50 (-17 - 44.06)	160.78 (138.97 - 182.59)	<0.001 ²
LDH U/l	8067.71 (5410.71 - 10724.72)	4663.25 (2626.52 - 6699.98)	20709.11 (16993.86 - 24424.36)	<0.001 ³

¹Control group differs from both SA (p=0.015) and SP (p<0.001, Dunnett's T3 test); no difference detected between SA and SP (p=0.197, Dunnett's T3 test).

²Statistically significant difference (Dunnett's T3 test) for all group comparisons (p<0.001).

³Control group differs from both SA (p=0.015) and SP (p<0.001, Dunnett's T3 test); no difference detected between SA and SP (p=0.098, Dunnett's T3 test).

Table 2 shows the levels of complement activation products in pleural fluid 12 h after intrapleural inoculation. A statistical difference was observed between the groups by ANOVA (p<0.01). Dunnett's post-hoc test confirmed significant differences in C3a levels between the control group vs. the SA and SP groups (p<0.001). However, no differences were observed between the SA and SP groups (p=0.22) (Table 2).

Regarding C5a levels, the significant difference detected for all group comparisons (p<0.001) by ANOVA was confirmed by post hoc analysis (Table 2). C5b9 levels were similar in all groups (p=0.358) (Table 2).

Table 2 – Levels of complement activation products in pleural fluid 12 h after injection of bacteria or turpentine (control)

	SA (n=15)	SP (n=11)	Control (n=9)	p
	Mean ng/mL (95%CI)	Mean ng/mL (95%CI)	Mean ng/mL (95%CI)	
C3a	1066.82 (937.29-1196.35)	1188.28 (1095.65-1280.92)	679.13 (601.29-756.98)	<0.001 ¹
C5a	55.73 (41.22-70.23)	520.11 (278.92-761.3)	5.27 (1.68-8.85)	<0.001 ²
C5b9	15.02 (13.1-16.94)	16.63 (14.37-18.90)	14.05 (9.8-18.29)	0.358

¹Control group differs from both SA and SP (p<0.001, Dunnett's T3 test); no difference detected between SA and SP (p=0.22, Dunnett's T3 test).

²Statistically significant difference (Dunnett's T3 test) for all group comparisons: SA vs. control, p<0.001; SP x control, p=0.002; and SA vs. SP, p=0.005.

ROC analysis of traditional markers (LDH, glucose, and protein) and complement activation product levels (considering as diseased the rats exposed to SA and SP) revealed areas under the curve (AUC) of 0.33, 0.921, and 0.891 for LDH, glucose, and protein respectively, and 1.0, 0.987, and 0.757 for C5a, C3a, and C5b9 respectively. Figure 1 shows ROC curves for glucose and protein. Figure 2 shows ROC curves for complement activation products. The best cutoff points to detect empyema in this experimental model were 13.604 ng/mL for C5a (sensitivity and specificity close to 100%); 740.15 ng/mL for C3a (sensitivity close to 100% and specificity of 88%); and 824.87 ng/mL for C5b9 (sensitivity of 92.3% and specificity close to 100%).

Figure 1 Specificity and sensitivity of protein and glucose to detect infected pleural effusion in a rat model.

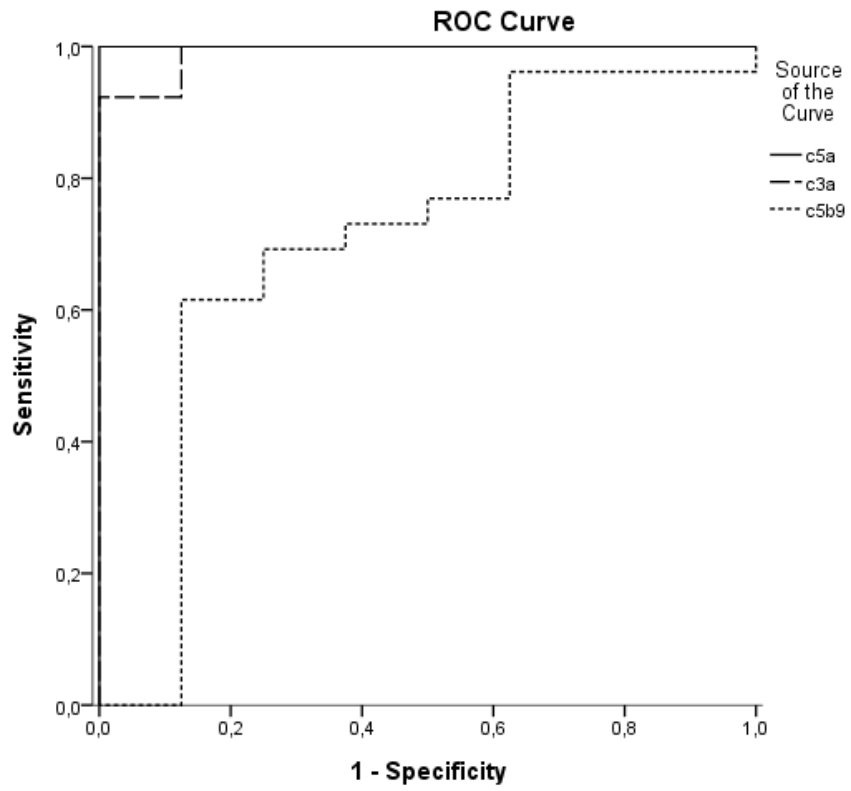
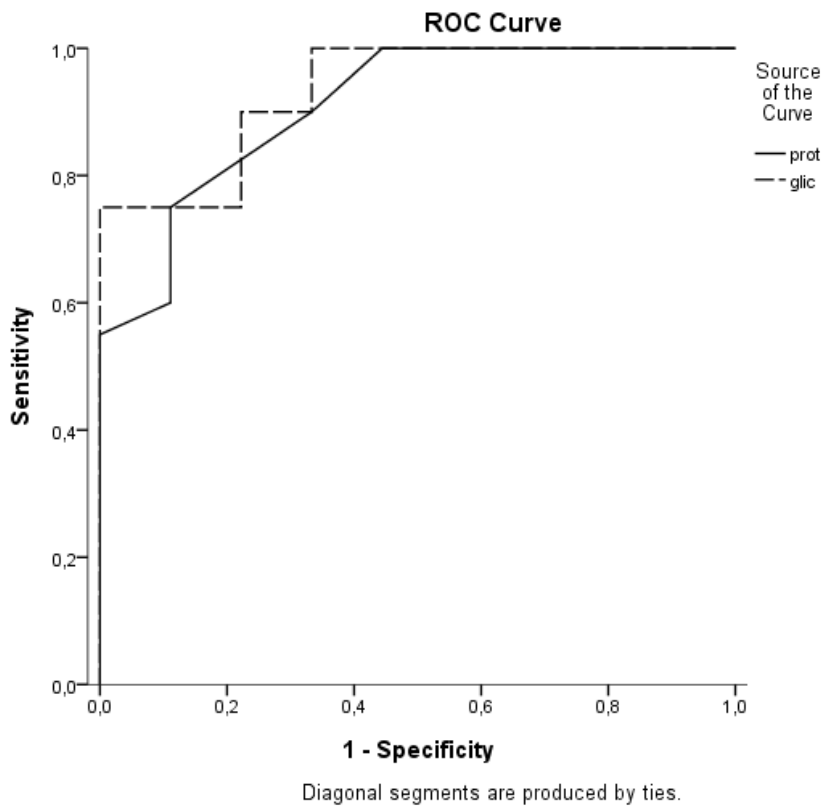


Figure 2. Specificity and sensitivity of complement activation products to detect infected pleural effusion in a rat model.



All animals (17 SA rats, 12 SP rats, and 10 control rats) underwent pathology examination. The distribution of microscopic findings was non-parametric. Thus, these results are presented as median (minimum-maximum range) (table 3). Kruskal-Wallis test revealed a difference between polymorphonuclear infiltrate, necrosis, and mesothelial hyperplasia; for polymorphonuclear infiltrate the adjusted significance found no difference, with $p=0.154$ for controls vs. SP; $p=0.51$ for SP vs. SA; and $p=1$ for controls vs. SA. Necrosis was significantly different ($p=0.008$) between SP and controls, but no difference was observed for the other comparisons (SA vs. SP: $p=0.840$; SA vs. controls: $p=0.351$). Mesothelial hyperplasia was different in the SA group vs. controls ($p=0.02$) and between SA vs. SP ($p=0.036$), but not between controls and SP ($p=1$).

Table 3 – Pathology analysis of infected pleural effusion in a rat model¹

Microscopic finding	SA (n=17)	SP (n=12)	Control (n=10)	p (Kruskal-Wallis)
	Median (min-max)	Median (min-max)	Median (min-max)	
Polymorphonuclear infiltrate	3 (0-3)	4 (1-4)	3 (0-3)	0.044
Lymphocytic infiltrate	0 (0-2)	0 (0-0)	0 (0-3)	0.081
Necrosis	1 (0-2)	0 (0-2)	1.5 (0-2)	0.046
Fibrin	0 (0-3)	1 (0-3)	1 (0-2)	0.126
Fibrosis	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	1
Hemorrhage	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	0.962
Granuloma	0 (0-0)	0 (0-0)	0 (0-0)	1
Mesothelial hyperplasia	1 (0-2)	0 (0-1)	0 (0-1)	0.008

¹A score ranging from 0 to 5 was assigned by a pathologist blinded to study group for each finding.

Levels of C3a, C5a, protein, LDH and glucose were compared in animals with non-programmed death (after 12 h and before 24 h) vs. animals that were euthanized at 24 h. No differences were observed between the groups.

Discussion

In the present study investigating the accuracy of complement activation product levels to detect infected pleural effusion in a rat model of bacteria-induced empyema, the three groups (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, and turpentine) developed pleural fluid compatible with exudate based on the concentration of LDH and protein. Complement activation fragments C3a and C5a (and particularly C5, with AUC of 1.0) were capable of discriminating bacteria-infected pleural exudate from sterile exudate produced by injection of a chemical irritant. This finding suggests that these biomarkers are sufficiently accurate to detect infected parapneumonic pleural effusions requiring treatment.

Several experimental models of empyema are available, with different animals, including rabbits, guinea pigs, and rats.^{14,18–25} Previous studies have shown that rat models are useful to evaluate diagnostic tests, and also that these models effectively reproduce infected pleural effusion.^{18–20} In addition, the costs associated with the acquisition and housing of rats are lower as compared to rabbits and guinea pigs^{22,23,26–28}.

Previous studies²⁵ have employed thoracotomy to induce empyema, which required intubation and mechanical ventilation. The use of a pressure meter allowed injection of bacteria through pleural puncture, with greater safety, making the procedure simpler, safer, and less costly. In addition, ultrasound was advantageously used not only to identify pleural fluid, but also to guide thoracentesis, playing a crucial role in the successful collection of small volumes of intrapleural fluid.

Even though the use of turpentine to induce an inflammatory response is not new,^{14–16,23,26,28–30} this chemical irritant had never been used to induce sterile pleural effusion in rats. In the present study, this allowed us to compare sterile exudate with bacteria-infected exudate confirmed by LDH and protein measurements. Because inoculation of turpentine caused major pain in the animals, inducing antalgic posture and gait as well as major tachypnea, tramadol was added to the management protocol, with adequate control of pain.

The literature^{14,16,20,23,24,26,28} describes loss of experimental animals ranging from 22% to 35%. Thus, the 25% loss recorded in the present study was consistent with the reported rates.

Some limitations of the present work must be addressed. Because no previous studies using rat models for dosing of C5a, C3a, and C5b9 were available, we were not able to calculate the sample size. The number of animals was defined based on previous work with rat models of empyema focusing on other aspects, and empyema mortality was high even prior to fluid sampling. Another limitation was the impossibility of measuring pH and perform cell counts due to the small amount of effusion obtained in the first collection.

In conclusion, the present experimental study showed significantly higher levels of C3a and

C5a in empyema induced by intrapleural injection of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus pneumoniae* as compared to the levels detected in sterile effusion. This suggests that these complement activation fragments may be effective biomarkers of infected parapneumonic effusion. Nevertheless, studies with humans are still required to confirm our findings and warrant the use of these complement activation fragments for early detection of empyema.

REFERENCES

- 1 Schultz KD, Fan LL, Pinsky J, Ochoa L, Smith EO, Kaplan SL, Brandt ML. The changing face of pleural empyemas in children: epidemiology and management. *Pediatrics* 2004;113: 1735-1740.
- 2 Thomas R, Lee YCG. Causes and management of common benign pleural effusions. *Thorac Surg Clin* 2013;23: 25-42, v-vi.
- 3 Burgos J, Falcó V, Pahissa A. The increasing incidence of empyema. *Curr Opin Pulm Med* 2013;19: 350-356.
- 4 Wu PS, Chang IS, Tsai FY, Hsieh YC, Shao PL, Chang LY, Huang LM. Epidemiology and impacts of children hospitalized with pneumonia from 1997 to 2004 in Taiwan. *Pediatr Pulmonol* 2009;44:162-166.
- 5 Lin T, Hwang P, Liu C. Etiology of empyema thoracis and parapneumonic pleural effusion in Taiwanese children and adolescents younger than 18 years of age. *Pediatr Infect Dis J* 2013;32:419-421.
- 6 Hernández-Bou S, García-García JJ, Esteva C, Gené A, Luaces C, Muñoz Almagro C. Pediatric parapneumonic pleural effusion: epidemiology, clinical characteristics, and microbiological diagnosis. *Pediatr Pulmonol* 2009;44:1192-1200.
- 7 Corcoran JP, Wrightson JM, Belcher E, Decamp MM, Feller-kopman D, Rahman NM. Pleural infection: past, present, and future directions. *Lancet Respir Med* 2015;3:563-577.
- 8 Bhatnagar R, Maskell NA. Treatment of complicated pleural effusions in 2013. *Clin Chest Med* 2013;34:47-62.
- 9 Ahmed RA, Marrie TJ, Huang JQ. Thoracic empyema in patients with community-acquired pneumonia. *Am J Med* 2006;119:877-883.
- 10 Vives M, Porcel J, Gázquez I, Pérez B, Rubio M. Pleural SC5b-9: a test for identifying complicated

parapneumonic effusions. *Respiration* 2000; 67:433-438.

- 11 Porcel J. Pleural fluid tests to identify complicated parapneumonic effusions. *Curr Opin Pulm Med* 2010;16:357-361.
- 12 Porcel JM, Vives M, Esquerda A. Tumor necrosis factor- α in pleural fluid. *Chest* 2004;125:160-164.
- 13 Fraga JC, Amantéa S, Argenta R, Moura L, Nhuch C, Borowski S. [Experimental empyema in rats through intrapleural injection of bacteria]. *J Pediatr (Rio J)* 2001;77: 469-474.
- 14 Sasse SA, Causing LA, Mulligan ME, Light RW. Serial pleural fluid analysis in a new experimental model of empyema. *Chest* 1996;109:1043-1048.
- 15 Ahmad G, Sial GZK, Ramadori P, Dudas J, Batusic DS, Ramadori G. Changes of hepatic lactoferrin gene expression in two mouse models of the acute phase reaction. *Int J Biochem Cell Biol* 2011; 43:1822-1832.
- 16 Paulson WD, Hearsh-Holmes M, Stogner SW, Campbell GD, Kirk KA, George RB. Anion gap in turpentine-induced pleural effusions. Correlation with pH and protein level. *Chest* 1996;109: 504-509.
- 17 Brazil, Office of the President. Lei No. 11794 of 8 October, 2008. Available from: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/11794.htm Accessed May 24, 2016.
- 18 Mavroudis C, Ganzel BL, Cox SK, Polk HC. Experimental aerobic-anaerobic thoracic empyema in the guinea pig. *Ann Thorac Surg* 1987;43:298-302.
- 19 Schopf LF, Fraga JC, Amantéa SL, Sanches P, Muller A, Borowski S, Kulczynski J, Costa E. Induction of pleural empyema in rats by thoracentesis with intrapleural pressure monitoring. *Pediatr Surg Int* 2004;20: 515-519.

- 20 Sasse SA, Jadus MR, Kukes GD. Pleural fluid transforming growth factor-beta1 correlates with pleural fibrosis in experimental empyema. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:700-705.
- 21 Martha VF, Fraga JC, Amantéa SL, Sanches P, Kulczynski J, Machado DP, Canani F. Tumor necrosis factor alpha in experimental empyema thoracis. *Pediatr Pulmonol* 2010;45:1201-1204.
- 22 Kunz CR, Jadus MR, Kukes GD, Kramer F, Nguyen VN, Sasse SA. Intrapleural injection of transforming growth factor-beta antibody inhibits pleural fibrosis in empyema. *Chest* 2004;126:1636-1644.
- 23 Ham KN, Hurley J V. Acute inflammation: An electron-microscope study of turpentine-induced pleurisy in the rat. *J Pathol Bacteriol* 1965;90:365-377.
- 24 Genofre E, Vargas F Experimental empyema in rats through intrapleural injection of bacteria. *J Pediatr (Rio J)* 2001;77:469-474.
- 25 Tonietto TF, Pilla ES, Madke GR, Silva UL, Felicetti JC, Camargo JJP, Cardoso MRI, Nonnig RB, Cardoso, Paulo FG. Empiema pleural experimental em ratos: avaliação dos efeitos do uso intrapleural de dextran-40 na fase fibrinopurulenta. *J Bras Pneumol* 1999;25:147-152.
- 26 Liapakis IE, Light RW, Pitiakoudis MS, Karayiannakis AJ, Giamarellos- Bourboulis EJ, Ismailos G, Anagnostoulis S, Simopoulos CE, Bouros DE. Penetration of clarithromycin in experimental pleural empyema model fluid. *Respiration* 2005;72:296-300.
- 27 Allen SS, Cassone L, Lasco TM, McMurray DN. Effect of neutralizing transforming growth factor beta1 on the immune response against mycobacterium tuberculosis in guinea pigs. *Infect Immun* 2004;72:1358-1363.
- 28 Strange C, Allen ML, Harley R, Lazarchick J, Sahn SA. Intrapleural streptokinase in experimental empyema. *Am Rev Respir Dis* 1993;147:962-966.
- 29 Shoheit I, Yellin A, Meyerovitch J, Rubinstein E. Pharmacokinetics and therapeutic efficacy of

gentamicin in an experimental pleural empyema rabbit model. *Antimicrob Agents Chemother* 1987;31:982-985.

30 Jinbo T, Sakamoto T, Yamamoto S. Serum alpha2-macroglobulin and cytokine measurements in an acute inflammation model in rats. *Lab Anim* 2002;36:153- 157.

6.7 LIST OF TABLES

Table 1 – Biochemical analysis of pleural fluid 12 h after injection of bacteria or turpentine (control)	p. 50
Table 2 – Levels of complement activation products in pleural fluid 12 h after injection of bacteria or turpentine (control)	p. 51
Table 3 – Pathology analysis of infected pleural effusion in a rat model	p. 53

6.8 LIST OS FIGURES

Figure 1 - Specificity and sensitivity of protein and glucose to detect infected pleural effusion in a rat model. p. 52

Figure 2. Specificity and sensitivity of complement activation products to detect infected pleural effusion in a rat model. p 52

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos diagnósticos para detectar a presença de infecção do derrame pleural parapneumônico tem a intenção de prontamente iniciar-se o tratamento mais adequado. O presente estudo experimental identificou a fração C3a e C5a como possíveis marcadores de infecção, que podem ser usados para diferenciar derrame estéril de empiema.

O uso do modelo experimental permitindo a coleta múltipla, com uso de ecografia, assim como a indução de derrame pleural estéril permitiu a realização de comparações úteis para realização de estudos comparativos, melhorando os estudos estatísticos dos resultados.

Futuros estudos poderão ser realizados no ambiente clínico para avaliar o uso da dosagem de C3a e C5a como marcadores de empiema, visando o tratamento precoce, antes da progressão do empiema.

8. ANEXOS

PLANILHA DE COLETA DE DADOS

1-Identificação

Rato n_____ Grupo _____ Peso _____g Idade _____

2- Intervenção

2.1-Inoculação: Dia ____/____/____ Hora _____

2.2-Toracocentese:

T1 : Dia_____/_____/_____ Hora_____ Volume coletado:_____

T2 : Dia_____/_____/_____ Hora_____ Volume coletado:_____

T3 : Dia_____/_____/_____ Hora_____ Volume coletado:_____

2.3-Eutanasia Dia ____/____/_____ Hora:_____

3- Achados macroscópicos

3.1-Ecografia: Derrame (S) (N)

3.2-Aspecto do derrame após punção (T1):

() Purulento () Citrino

3.3-Aspecto do derrame após punção (T2):

() Purulento () Citrino

3.4-Aspecto do derrame após eutanásia (T3):

() Purulento () Citrino

3.5-Avaliação macroscópica da cavidade:

() 0 () 1 () 2 () 3

4- Avaliação microscópica da biópsia pleural e pulmonar:

4-Achados laboratoriais

4.1-Bioquímica

4.1.1-pH T1:_____ T2:_____ T3:_____

4.1.2-Proteínas totais T1:_____ T2:_____ T3:_____

4.1.3-Glicose: T1:_____ T2:_____ T3:_____

4.1.4-LDH T1:_____ T2:_____ T3:_____

4.1.5 Dosagem da TGF beta-1: T1:_____ T2:_____ T3:_____

4.2 Histologia: