

Estudo da ação inflamatória aguda do tiopental intraperitoneal em ratos

[*Acute inflammatory action of thiopental intraperitoneal in rats*]

A.B. Carregaro¹, M.B. Castro¹, F.S. Martins²

¹Universidade de Franca
Av. Doutor Armando Salles Oliveira, 201
14440-000 – Franca, SP

²Estudante de graduação - Universidade de Franca

RESUMO

Determinou-se a ação inflamatória aguda do tiopental intraperitoneal (IP) utilizando-se 72 ratos, divididos em grupo-tratado (40mg/kg de tiopental a 2,5% IP) e grupo-controle (0,25ml de solução fisiológica IP). Para determinar o processo inflamatório, colheu-se o lavado peritoneal às 2, 6, 12, 24 e 48h após a inoculação. Os animais foram anestesiados com isoflurano e submetidos à eutanásia por secção dos vasos cervicais. Administraram-se 5ml de solução fisiológica heparinizada por via IP e, após homogeneização, divulsionou-se o peritônio e colheu-se a amostra. Determinaram-se a dosagem de proteínas plasmáticas (PP), a contagem global (CGL) e a diferencial (CDL) de leucócitos. Não foi observada diferença na PP entre os grupos em nenhum momento exceto às 2h. Entre os momentos, a dosagem foi superior às 6 e 12h nos dois grupos. Não houve diferença entre os grupos para a CGL. Entre os momentos, a CGL diferiu dos demais às 6h em ambos os grupos. Verificou-se o mesmo perfil para a CDL entre os grupos exceto para os eosinófilos às 6h. Entre os momentos, os valores foram diferentes em relação aos neutrófilos em ambos os grupos, às 6 e 12h. Observou-se reação inflamatória aguda no processo provavelmente desencadeada pela ação mecânica da injeção. A eosinofilia observada no grupo-tratado após 6h sugere uma certa ação irritante do tiopental.

Palavras-chave: inflamação, rato, tiopental

ABSTRACT

The acute inflammatory action of thiopental intraperitoneal (IP) in rats was studied. Seventy two animals were divided in treated (40mg/kg of thiopental, 2.5% IP) and control (0.25ml of saline solution IP) rats. In order to evaluate the inflammatory process, peritoneal fluid was taken at 2h, 6h, 12h, 24h e 48h after drug administration. The animals were anesthetized with isoflurane and submitted to euthanasia through cervical vessels section. Five millilitres of heparinized saline solution were injected IP, homogenized by abdomen massage and then withdrawn. Plasma protein (PP), global leukocyte count (GLC) and differential leukocyte count (DLC) were analysed. No difference in PP intergroup at any moment was observed, but at 2h. Intragroup, PP was higher between 6 and 12h in both groups. There was no statistical difference of GLC intergroup. There was a difference ($P<0.05$) of GLC results between groups at 6h post-injection. There was a similar pattern of DLC intergroups, except eosinophil cells at 6h. Intragroup cell counts of neutrophils were different ($P<0.05$) in both groups at 6 and 12h. The acute inflammatory reaction observed was probably triggered by the mechanically action of injection. The eosinophilia observed in treated group after 6h suggests some irritant action of thiopental.

Keywords: rat, inflammation, thiopental

Recebido para publicação em 11 de dezembro de 2003

Recebido para publicação, após modificações, em 25 de maio de 2004

E-mail: carregaro@anesteiruvet.com.br

INTRODUÇÃO

Atualmente, devido à facilidade de produção, manutenção e manuseio, considerável parcela das pesquisas científicas é realizada com roedores em que, por vezes, se faz necessária a imobilização temporária do animal. A anestesia inalatória nesses animais apresenta limitações, principalmente devido a intubação orotraqueal (Massone, 2003). Com isso, têm-se utilizado barbitúricos de ultracurta duração, como o tiopental sódico, os quais proporcionam um período hábil anestésico adequado para a maioria dos procedimentos clínicos ou cirúrgicos (Flecknell, 1996; Massone, 2003).

Em ratos, o tiopental sódico é utilizado pela via intraperitoneal em doses de 30 a 50mg/kg (Thurmon et al., 1996). A anestesia se faz presente em um a dois minutos com duração de 10 a 15 minutos (Flecknell, 1996; Massone, 2003). Produz decréscimo tanto na pressão arterial quanto no débito cardíaco, apesar da discreta taquicardia (Kerger et al., 1997). Há inibição dos barorreceptores aórtico e carotídeo, agravando a depressão cardiovascular (Fan et al., 1996). Observa-se, ainda, redução na frequência respiratória, aumento na PaCO₂ e conseqüente acidose respiratória (Svenden e Carter, 1985).

A diminuta massa corporal dos ratos faz com que a administração intravenosa de qualquer substância seja dificultada. Assim, geralmente as vias intraperitoneal (IP) e subcutânea são as mais empregadas. Com isso, não há a possibilidade de administração gradual de anestésicos, sendo realizada em uma única dose. Ao adotar um volume padrão de anestésico para todos os animais, corre-se o risco de subdoses, impossibilitando o procedimento cirúrgico, ou superdoses que, além de prolongar o período hábil anestésico, proporcionaria significativo aumento nos efeitos deletérios, podendo culminar em morte.

Uma das adversidades na utilização do tiopental é a administração acidental perivascular. Devido à diferença de pH entre a solução que contém o fármaco e o meio, há uma irritação local com sinais clínicos de dor e inflamação, podendo levar à necrose em casos extremos (Davies, 1979; Hall e Clarke, 1987; Mao et al., 1997; Trim, 1999).

A cavidade peritoneal, apesar de proporcionar absorção mais rápida que a via subcutânea, não propicia condição igual à intravenosa. Com isso, pode-se pensar em uma possível irritação nos constituintes desta, como peritônio e vísceras, já que o fármaco ficará por algum tempo na cavidade.

Este trabalho teve o objetivo de determinar a ação inflamatória aguda do tiopental, administrado por via IP, em ratos.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 72 ratos da raça Wistar, machos adultos, com peso entre 180 e 250g, provenientes do Biotério da Universidade de Franca.

Para avaliar a ocorrência de processo inflamatório, os animais foram divididos em dois grupos, controle e tratado, e subgrupos de acordo com o tempo de colheita do lavado peritoneal. O grupo-controle recebeu 0,25ml de solução fisiológica e o tratado 40mg/kg de tiopental sódico a 2,5%, ambos por via IP. Para a contagem de células, realizou-se a colheita às 2, 6, 12, 24 e 48h pós-administração de tiopental ou solução salina.

Para a colheita do lavado, os animais foram submetidos à anestesia inalatória com isoflurano¹ e posterior exsanguinação através de secção dos vasos cervicais. Após isso, divulsionou-se a pele da região abdominal ventral e administraram-se 5ml de solução fisiológica contendo EDTA (10%, pH 7,4), com auxílio de uma agulha 13×4 a fim de promover o mínimo trauma na vasculatura peritoneal. Massageou-se o abdome do animal para homogeneizar o lavado. Incisou-se o peritônio e colheu-se o lavado peritoneal com uma pipeta Pasteur.

Colhido o lavado, retirou-se uma alíquota para contagem global de leucócitos². O restante foi centrifugado por três minutos a 626g. Separaram-se o sobrenadante, para dosagem de proteínas plasmáticas³, e o sedimento, para contagem diferencial de leucócitos pela coloração HE, por microscopia óptica.

¹ Isoflurane®. Cristália Prod. Farm. Ltda, SP.

² Celm CC 530. Cia Equip. Lab. Mod., SP.

³ Labquest®. Labtest Diagnóstica, MG.

Utilizou-se análise de variância (Hoel, 1974) para repetições múltiplas (amostras não-pareadas), para avaliação de proteínas plasmáticas e para contagem global de leucócitos e contagem diferencial de leucócitos, seguida pelo teste Tukey, quando necessário, para comparação de médias. A comparação entre os grupos foi realizada pelo teste *t*. Os valores foram expressos em média±desvio padrão e considerados significativos quando $P<0,05$.

RESULTADOS

Observou-se o mesmo perfil na dosagem de proteínas plasmáticas entre os grupos em todos os momentos exceto às 2h, em que o grupo-tratado apresentou dosagem superior à do controle ($P<0,05$). Entre os momentos, houve elevação das proteínas plasmáticas no lavado peritoneal em ambos os grupos às 6 e 12h, acima de 140mg/dl ($P<0,05$). Após isso, os valores oscilaram entre 110 e 130mg/dl (Fig. 1).

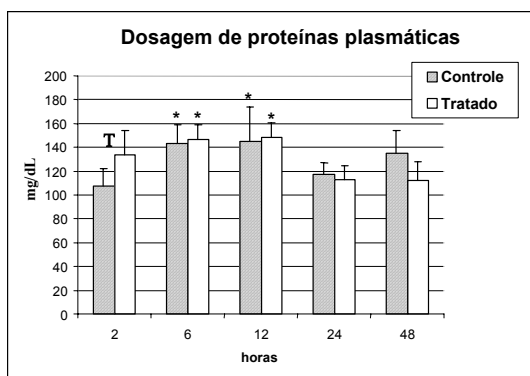


Figura 1. Dosagem de proteínas plasmáticas no lavado peritoneal de ratos submetidos à anestesia por tiopental.

* Diferença significativa entre os momentos dentro do grupo ($P<0,05$).

T: diferença significativa entre os grupos no mesmo momento ($P<0,05$).

A contagem global de leucócitos foi semelhante nos dois grupos, seguindo o mesmo padrão no

decorrer dos momentos, não diferindo entre eles. Entre os tempos, observou-se aumento às 6h, obtendo-se pico leucocitário próximo a $10 \times 10^3/\text{ml}$ ($P<0,05$). Após isso, as contagens oscilaram entre $6-8 \times 10^3/\text{ml}$ leucócitos (Fig. 2).

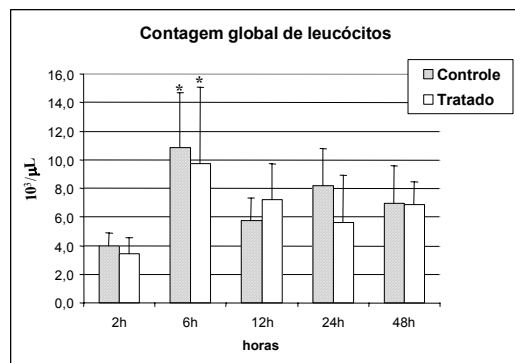


Figura 2. Contagem global de leucócitos em lavado peritoneal de ratos submetidos à anestesia por tiopental.

* Diferença significativa entre os momentos dentro do grupo ($P<0,05$).

Mediante contagem diferencial de leucócitos, observou-se diferença na migração celular, de acordo com os tempos (Fig. 3). Nos momentos 6 e 12h, houve elevação na contagem de neutrófilos em ambos os grupos, mas não houve diferença entre grupos. O grupo-controle diferiu estatisticamente em relação às 2h ($P<0,05$). Em ambos os grupos predominaram neutrófilos íntegros e segmentados.

A contagem de eosinófilos seguiu um perfil constante em todos os momentos, com aumento na migração deles no grupo-tratado em relação ao controle às 2 e 6h, diferindo estatisticamente entre si nesse último momento.

Os dois grupos apresentaram o mesmo perfil na contagem de mononucleares, e, como esperado, foi inversamente proporcional à contagem de neutrófilos. A porcentagem de neutrófilos foi menor desde 6 até 24h pós-administração.

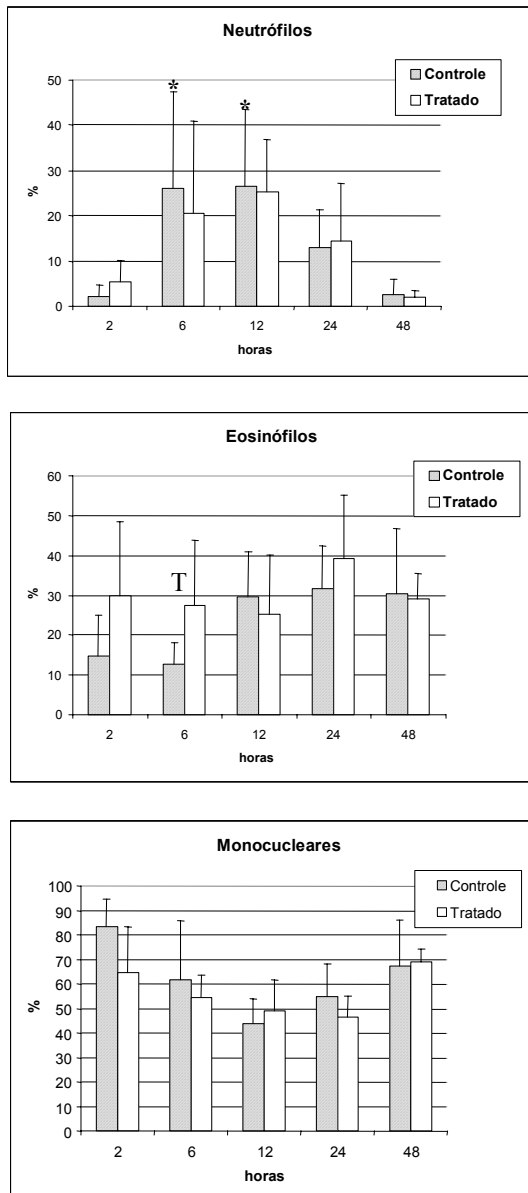


Figura 3. Contagem diferencial de leuc3citos em lavado peritoneal de ratos submetidos 3 anestesia por tiopental.

* Diferen3a significativa entre os momentos dentro do grupo ($P < 0,05$). T: diferen3a significativa entre os grupos no mesmo momento ($P < 0,05$).

DISCUSS3O

O pKa do tiopental 3 de 7,6 e o pH da formula3o utilizada na rotina anest3sica 3 diferente do pH do perit3neo (Cristensen et al., 1983). Essa situa3o pode promover rea3o

inflamat3ria de origem qu3mica, o que desencadearia uma rea3o contra o agente irritante, podendo ocorrer desde uma simples dor local e rubor at3 necrose (Davies, 1979; Hall e Clarke, 1987; Mao et al., 1997; Trim, 1999).

A partir das dosagens de prote3nas plasm3ticas, verificou-se um perfil homog3neo entre os grupos. A diferen3a entre os grupos nas primeiras duas horas n3o se manteve ao longo dos momentos, podendo-se afirmar que a rea3o de hipersensibilidade promovida pelo tiopental n3o caracterizou desequil3brio na permeabilidade vascular, fato observado em rea3es inflamat3rias agudas. Soma-se a isso as diferen3as, quando comparadas dentro de cada grupo. Mesma com aumento significativo 3s 6 e 12 horas, n3o se observou discrep3ncia entre os momentos, comprovando a integridade vascular.

A contagem global de leuc3citos evidenciou aumento na migra3o celular 6h p3s-inje3o. Entretanto, n3o se p3de justificar o fato pelo f3rmaco utilizado, uma vez que em ambos os grupos observou-se o acontecido. Desse modo, a quimiotaxia pode ter sido desencadeada pelo modo de administra3o, ou seja, o trauma da agulha no perit3neo deve ter sido o principal respons3vel pelo aumento quimiot3tico.

Cotran et al. (1989) citaram que os processos inflamat3rios ocasionados por material est3ril estranho ao organismo, como os utilizados em cirurgia, n3o chegam a promover sintomas cl3nicos e h3 apenas a possibilidade de granulomas, fibroses ou ader3ncias. A rea3o inflamat3ria observada mediante contagem global sugere que o processo traum3tico n3o promoveu maiores danos aos tecidos envolvidos, pois ap3s 6h o n3mero total de leuc3citos diminuiu.

A contagem diferencial de c3lulas demonstrou um fato caracter3stico de processo inflamat3rio agudo, em que o n3mero de neutr3filos foi superior nos momentos 6 e 12 horas em rela3o aos outros. Segundo Cotran et al. (1989), os neutr3filos predominam nas primeiras 24 horas do processo inflamat3rio devido, principalmente, 3 ativa3o do processo quimiot3tico ser mais r3pida do que para outras c3lulas.

O predom3nio de neutr3filos 3ntegros e segmentados refor3a a sugest3o de rea3o de

hipersensibilidade. Eles apresentam-se idênticos aos do sangue circulante, podendo inclusive ser hipersegmentados, sugerindo fluido asséptico. Ao contrário, quando degenerados, indicam a presença de endotoxinas e exotoxinas, as quais causam aumento da permeabilidade da membrana e subsequente degeneração hidrópica (Olson et al., 1995) A presença desse tipo de neutrófilo sugere infecção bacteriana, o que não foi observado neste estudo.

Jones et al. (2000) salientaram que em reações de hipersensibilidade há predominância de eosinófilos, o que pode explicar, na maioria dos momentos estudados, a maior porcentagem deles em relação à de neutrófilos. A maior incidência de células eosinofílicas no grupo-tratado às 6h sugere uma resposta mais exacerbada atribuída à ação do tiopental, caracterizando uma resposta quimiotática para o fármaco. Tais observações divergem do estudo realizado por Krumholz et al. (1999), que demonstraram o poder inibitório na quimiotaxia eosinofílica com tiopental.

A resposta ao procedimento anestésico com tiopental foi moderada quando comparada à do controle. Os dois grupos apresentaram processo inflamatório agudo, o que pode ser explicado pelo trauma da injeção. Entretanto, não se deve descartar a ação irritante do tiopental, já que no grupo tratado houve migração eosinofílica maior que no controle.

Assim, deve-se atentar para a contagem de células inflamatórias em estudos que utilizem substâncias irritantes nos modelos inflamatórios, principalmente na fase aguda, para não incorporarem o aumento leucocitário, decorrente do traumatismo da injeção do tiopental, ao atribuído a esse medicamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHRISTENSEN, J.H.; ANDERSEN, F.; JENSEN, E.B. The binding of thiopental to human serum albumin at variable pH and temperature. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, v.5, p.364-70, 1983.
- COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. *Robbins pathologic basis of disease*. 4.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1989. 1519p.
- DAVIES, D.D. Local complications of thiopentone injection. A further report. *Br. J. Anaesth.*, v.12, p.147-149, 1979.
- FAN, W.; REYNOLDS, P.J.; ANDRESEN, M.C. Baroreflex frequency-response characteristics to aortic depressor and carotid sinus nerve stimulation in rats. *Am. J. Physiol.*, v.271, p.2218-2227, 1996.
- FLECKNELL, P.A. *Laboratory animal anaesthesia*. 2.ed. London: Academic, 1996. 274p.
- HALL, L.W.; CLARKE, K.W. *Anestesia veterinária*. 8.ed. São Paulo: Manole, 1987. 680p.
- HOEL, P.G. *Elementary statistics*. 3.ed. New York: John Wiley & Sons, 1974. 368p.
- JONES, T.C.; HUNT, R.D.; KING, N.W. *Patologia veterinária*. 6.ed. São Paulo: Manole, 2000. 1415p.
- KERGER, H.; SALTZMAN, D.J.; GONZALES, A. et al. Microvascular oxygen delivery and intestinal oxygenation during sodium pentobarbital anesthesia. *Anesthesiology*, v.86, p.372-386, 1997.
- KRUMHOLZ, W.; ABDULLE, O.; KNECHT, J. et al. Effects of i.v. anaesthetic agents on the chemotaxis of eosinophils in vitro. *Br. J. Anesth.*, v.2, p.333-335, 1999.
- MAO, C.C.; HSIEH, Y.C.; HSEU, S.S. et al. EMLA cream and lidocaine local injection in the treatment of extravenuous thiopental injection – a case report. *Acta Anaesthesiol. Sin.*, v.2, p.103-6, 1997.
- MASSONE, F. *Anestesiologia veterinária*. 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 326p.
- MEADOWS, R.L.; MacWILLIAMS, P.S. Chylous effusions revisited. *Vet. Clin. Pathol.*, v.23, p.54-62, 1994.
- OLSON, N.C.; HELLYER, P.W.; DODAM, J.R. Mediators and vascular effects in response to endotoxin – Review. *Br. Vet. J.*, v.151, p.489-522, 1995.
- SVENDEN, P.; CARTER, A.M. Influence of injectable anaesthetic combinations on blood gas tensions and acid-base status in laboratory rats. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, v.57, p.1-7, 1985.
- THURMON, J.C.; TRANQUILLI, W.J.; BENSON, G.J. *Lumb & Jones' veterinary anesthesia*. 3.ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. 928p.
- TRIM, C.M. Anesthetic emergencies and complications. In: PADDLEFORD, R.R. *Manual of small animal anesthesia*. 2.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1999. 423p.
- TYLER, D.R.; COWELL, R.L. Evaluation of pleural and peritoneal effusions. *Vet. Clin. North Am.: Small Anim. Pract.*, v.19, p.743-769, 1989.
- WILKINSON, P.C. *Chemotaxis and inflammation*. 2.ed. Edinburgh: Churchill-Livingstone, 1982. p.1-249.