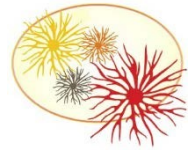




UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS



**EFEITOS DO PNEUMOPERITÔNIO NA HISTOLOGIA E BIOMARCADORES DE
ESTRESSE OXIDATIVO TESTICULAR.**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Bruno Albuquerque De Almeida

RIO GRANDE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIO GRANDE - FURG
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

Título: Efeitos do Pneumoperitônio na Histologia e Biomarcadores de Estresse Oxidativo Testicular.

BRUNO ALBUQUERQUE DE ALMEIDA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Rio Grande - FURG como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Carine Dahl Corcini

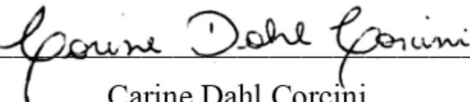
Rio Grande - RS

2018

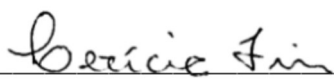
Bruno Albuquerque De Almeida

Título: Efeitos do Pneumoperitônio na Histologia e Biomarcadores de Estresse Oxidativo Testicular.

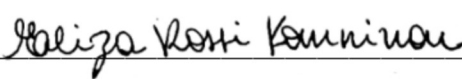
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Rio Grande - FURG como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas, aprovada pela comissão de avaliação abaixo assinada:



Carine Dahl Corcini
(Orientador - FURG)



Letícia Fiss (FURG)



Eliza Rossi Komninou (UFPEL)

Rio Grande, 16 de fevereiro de 2018 .

AGRADECIMENTOS

À minha namorada, por todos os anos que eu pude desfrutar de sua companhia, em qual foste um exemplo de profissional e de ser humano; por ser meu arrimo, guarida, e qualquer designação que tenha em sua base o companheirismo e o cuidado; por ser motivação, propulsão e guia, ou seja, tudo que eu precisaria para evoluir; se eu fosse te agradecer, uma folha seria pouco “... pra ti que merece tanto”, eu te amo!

À toda minha família, pela compreensão; pelo incentivo, por criarem um ambiente propício para que tudo pudesse acontecer na maior serenidade possível; por discutir, compreender e apoiar minhas escolhas pessoais, espero retribuir tudo que fazem por mim sempre que precisarem. Dentre família, incluo o Tramadol e outros animais, ponto de partida e chegada.

À minha orientadora, Prof. Dra. Carine Dahl Corcini, pela liberdade; pela orientação; pelo incentivo independente de resultados; pelo incentivo às minhas escolhas pessoais durante o período; por transmitir uma parte de seu conhecimento. Do mesmo modo, obrigado ao Prof. Dr. Antônio Sergio Varela Junior, meu co-orientador, por auxiliar em muito destes aspectos citados, e em especial pela tutoria em análises em Citometria de Fluxo, possibilitando que algo complexo, fosse compreensível e interessante.

Aos colegas da Universidade Federal de Pelotas, Andreia, Camila, Estela, Jenniffer, Jorge, Maria Eduarda, Norton e Sara, os quais eu pude conviver maior tempo durante o mestrado, obrigado pela parceria, pelos ensinamentos compartilhados, pelo período agradável, pelo auxílio em meus projetos, contem comigo.

Aos meus colegas da Universidade Federal de Rio Grande, Raquel, Lamia, Guilherme, Jéssica, Marcelo, Thiago e Vinicius pelo tempo prazeroso e conhecimento compartilhado.

Às professoras Eliza Rossi Komninou e Leticia Fiss, por terem aceitado o convite de participação na minha banca avaliadora da dissertação de mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação e Ciências Fisiológicas, seus discentes e docentes, pela boa recepção; pela experiência e conhecimento repassado durante as disciplinas; pela oportunidade de realização de interessantes treinamentos, cursos e disciplinas eletivas; por ser um local de crescimento pessoal, além de formação acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pelo auxílio financeiro ao estudante e projetos.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Figura A: Esquematização da criação do pneumoperitônio cirúrgico. O gás (CO ₂) é injetado através do insuflador no paciente anestesiado, a parede abdominal cede e se expande conforme aumenta a pressão intra-abdominal do gás, criando o pneumoperitônio.....	14.
Figura B: (I) Paciente canino em decúbito dorsal com dois portais já instalados. O gás utilizado para criação do pneumoperitônio é injetado através da mangueira (Ponta de seta). (II) Utilização de pinça para biópsia (Seta) através de um portal instalado em um paciente canino. Fonte: Vanessa Milech.....	14.
Figura C: Esquema dos mecanismos para geração de radicais livres de oxigênio, e de alterações celulares induzidas por isquemia-reperfusão.....	19.
Table 1 – Summary of the selected studies with pneumoperitoneum TE, IAP and histological degree of injury findings.....	37.
Figure 1 –Cosentino and Johnsen histological degree criteria.....	38.

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	9
2. ABSTRACT	10
3. INTRODUÇÃO	11
3.1. PNEUMOPERITÔNIO.....	11
3.2. PNEUMOPERITÔNIO E CIRURGIA MINIMAMENTE INVASIVA.....	13
3.3. EFEITOS FISIOLÓGICOS DO PNEUMOPERITÔNIO	14
3.4. MECANISMO DE LESÃO UTILIZANDO PNEUMOPERITÔNIO	14
3.5. MECANISMO DE LESÃO NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO.....	17
3.6. ESTRESSE OXIDATIVO E PNEUMOPERITÔNIO	18
3.7. INFERTILIDADE E SUBFERTILIDADE.....	19
3.8. LESÃO TESTICULAR E ALTERAÇÕES NA FERTILIDADE	20
4. OBJETIVOS	22
5. MANUSCRITO	23
5.1. ABSTRACT	26
5.2. INTRODUCTION	27
5.3. MATERIAL AND METHODS	28
5.3.1. <i>Search strategy</i>	28
5.3.2. <i>Selection of Studies</i>	28
5.3.3. <i>Inclusion and Exclusion Criteria</i>	28
5.4. RESULTS.....	29
5.4.1. <i>Testicular histopathology</i>	29
5.4.2. <i>Testicular oxidative stress</i>	30
5.5. DISCUSSION.....	30
5.6. CONCLUSIONS	33
5.7. REFERENCES	33
6. DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS	39
7. CONSIDERACOES FINAIS.....	41
8. BIBLIOGRAFIA GERAL.....	42

1. RESUMO

ALMEIDA, Bruno Albuquerque de. **Efeitos Do Pneumoperitônio Na Histopatologia E Estresse Oxidativo Testicular**. 2018. 42 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas. Universidade Federal de Rio Grande – FURG.

O pneumoperitônio é caracterizado pela presença de gás na cavidade abdominal, sendo utilizado na criação de espaço na cavidade abdominal para procedimentos cirúrgicos e diagnósticos através de videolaparoscopia. O pneumoperitônio é capaz de causar lesão no momento da insuflação da cavidade através da isquemia, e após a desinsuflação, pela reperusão, causado pelo desequilíbrio entre produção de radicais livres e a capacidade de defesa do sistema antioxidante. O objetivo foi realizar uma revisão sistemática para analisar o efeito de expor animais saudáveis a diferentes configurações de pneumoperitônio sobre biomarcadores de estresse oxidativo e histopatologia testicular. A revisão sistemática foi realizada no idioma inglês, nos bancos de dados Pubmed, ScienceDirect e Web of Science, utilizando os termos: pneumoperitoneum AND testi* or gonad. A pesquisa retornou 2209 artigos científicos. Após aplicar os critérios de inclusão e exclusão, seis artigos foram selecionados. Todos artigos verificaram o efeito do pneumoperitônio na estrutura testicular, utilizando pelo menos um sistema de pontuação Cosentino e Johnsen para avaliar a histopatologia dos testículos. Três estudos verificaram a ocorrência de mudanças nos biomarcadores de estresse oxidativo. De acordo com esta revisão de literatura, o pneumoperitônio utilizado em pressões intra-abdominais iguais a, ou maiores que 9 mmHg causaram alterações histológicas nos testículos dos animais utilizados. De acordo com os biomarcadores utilizados nos estudos, pressões iguais ou maiores que 10 mmHg foram suficientes para causar estresse oxidativo no ambiente testicular.

Palavras-chave: testículos, pressão intra-abdominal, lesão, laparoscopia.

2. ABSTRACT

Pneumoperitoneum is characterized by the presence of abdominal cavity gas and is used to create a space in the abdominal cavity for videolaparoscopic surgical procedures. It is capable of causing damage in insufflation induced by ischemia, and by reperfusion due to the deflation of the cavity, caused by an imbalance between free radical production and antioxidant defense system capacity. The objective of this study was to analyze the effect of exposing healthy animals to different pneumoperitoneum settings by assessing oxidative stress biomarkers and testicular histopathology through a systematic review. A systematic search was carried out in Pubmed, Science Direct and Web of Science, using the English following terms: pneumoperitoneum AND testi* or gonad. The survey conducted in the databases yielded 2209 scientific articles. After applying inclusion and exclusion criteria, six papers were selected. All the articles selected addressed the effects of pneumoperitoneum on testicular structure and used at least one scoring system to perform histopathological evaluation of the testis. Three studies verified the occurrence of changes in oxidative stress biomarkers. According to this literature review, pneumoperitoneum used at intra-abdominal pressures equal to, or greater than, 9 mmHg caused histological changes in animal model. According to the biomarkers used in studies, pressures equal or greater than 10 mmHg were sufficient to cause testicular oxidative stress.

Keywords: testis, intra-abdominal pressure, injury, laparoscopy.

3. INTRODUÇÃO

3.1. Pneumoperitônio

O pneumoperitônio é definido como o acúmulo de gás livre na cavidade peritoneal, também chamada de abdômen. O pneumoperitônio pode ocorrer em humanos e animais como uma manifestação de doenças intra-abdominais, porém, também pode ser utilizado como ferramenta para realização de procedimentos de diagnósticos médicos e veterinários, como a endoscopia, ou a realização de procedimentos cirúrgicos minimamente invasivos.

Outras causas de pneumoperitônio podem ser agrupadas em pós-operatórias, torácicas, abdominais, ginecológicas e idiopáticas. Esta condição pode ser encontrada em 85% dos pacientes que apresentam vísceras perfuradas, e, em sua maioria, são casos que devem ser resolvidos através de cirurgia. (Mularski et al., 1999). Uma das motivações para o estudo do pneumoperitônio e a busca pelo conhecimento dos efeitos associados à sua utilização está ligado ao caráter emergencial de doenças que o desencadeiam, como também aos efeitos locais e sistêmicos, diretos e indiretos.

O pneumoperitônio também pode ser utilizado para criação de espaço dentro da cavidade abdominal durante um procedimento videoassistido, onde normalmente a tensão da musculatura abdominal mantém um espaço mínimo necessário para os órgãos abdominais, não havendo possibilidade de manusear instrumentais. Este espaço é criado a partir da insuflação da cavidade abdominal através da injeção de gases, onde normalmente é utilizado dióxido de carbono como gás padrão, devido a suas especificidades, através do equipamento chamado insuflador, que injeta e mensura a pressão do gás dentro da cavidade abdominal (Figura A) (Lacy et al., 1998). Após a insuflação os procedimentos minimamente invasivos são realizados a partir de pequenos orifícios, onde são introduzidos portais (Figura AI), que possibilitam a

utilização de instrumentais (Figura AII), sendo o procedimento em si, diagnóstico ou cirúrgico, realizado guiado por uma câmera (Brun, 2015).

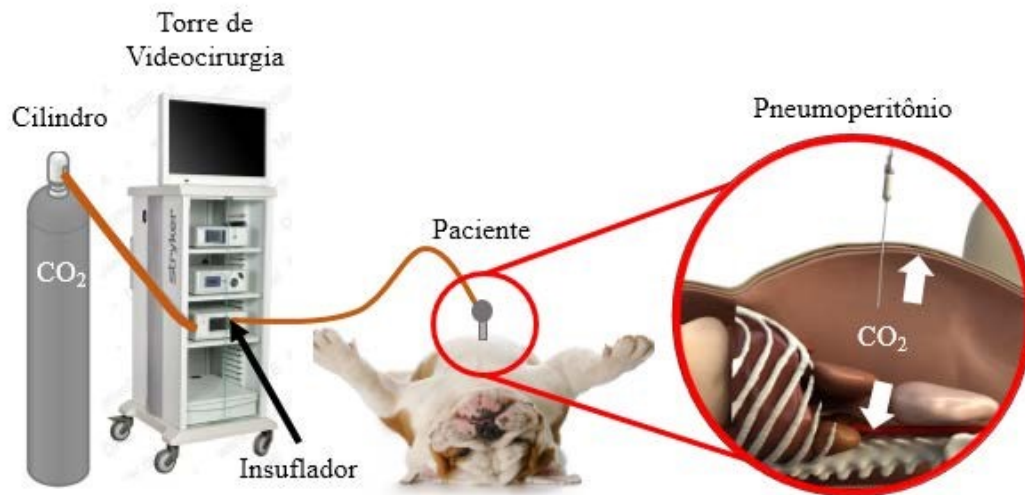


Figura A: Esquematização da criação do pneumoperitônio cirúrgico. O gás (CO_2) é injetado através do insuflador no paciente anestesiado, a parede abdominal cede e se expande conforme aumenta a pressão intra-abdominal do gás, criando o pneumoperitônio, que também pressiona os órgãos abdominais e torácicos.

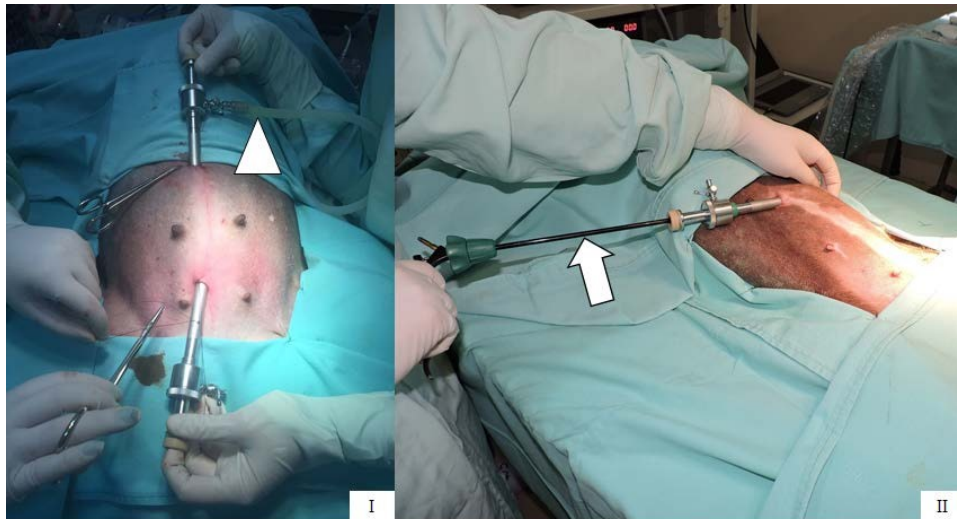


Figura B: (I) Paciente canino em decúbito dorsal com dois portais já instalados. O gás utilizado para criação do pneumoperitônio é injetado através da mangueira (Ponta de seta). (II) Utilização de pinça para biópsia (Seta) através de um portal instalado em um paciente canino. Fonte: Vanessa Milech.

3.2. Pneumoperitônio e cirurgia minimamente invasiva

Na literatura, há diversas vantagens na utilização dos procedimentos minimamente invasivos em comparação a cirurgia convencional, nestes, é utilizado pneumoperitônio, embora existam técnicas alternativas à sua utilização, a expansão da cavidade através da insuflação com gás é a mais comumente utilizada. A utilização destes procedimentos minimamente invasivos permite melhorar o prognóstico de pacientes humanos e animais, o bem-estar, e o gerenciamento hospitalar, pois resultam em uma diminuição no custo hospitalar, devido ao menor tempo de procedimento e de utilização da sala cirúrgica, no tempo de internação de pacientes (Glasgow et al., 2004). Também podem ser citadas como vantagens dos procedimentos laparoscópicos a diminuição do tamanho da incisão, da perda sanguínea, da dor e desconforto (Agha e Muir, 2003) e redução nas complicações relacionadas à ferida

(deiscência, infecção, herniação) (Henry e Thompson, 2001). Devido aos seus benefícios, ocorre sua ampla utilização na medicina humana, e sua transposição para a medicina animal.

3.3. Efeitos fisiológicos do pneumoperitônio

Os efeitos fisiológicos do pneumoperitônio são observados nos sistemas cardiovascular, respiratório, urológico, gastrointestinal, neurológico (Perrin e Fletcher, 2004) além de efeitos observados no próprio revestimento do abdômen, o peritônio (Brokelman et al., 2011). Quando se conhece os efeitos fisiológicos do pneumoperitônio também pode se observar que estes são responsáveis por possíveis complicações cirúrgicas, que podem ocorrer durante o trans e pós-operatório. O estudo das alterações fisiológicas provocadas pelo pneumoperitônio pode ser importante para conhecer as características deste procedimento e minimizar possíveis efeitos nocivos na utilização desta ferramenta.

3.4. Mecanismo de lesão utilizando pneumoperitônio

Dentre os efeitos fisiológicos do pneumoperitônio, cabe destacar quais são potencialmente lesivos em sua utilização, como também, é importante considerar a partir de que momento ocorre a perda da homeostase. Entre outros efeitos, iremos relacionar os que estão associados ao aumento da pressão intra-abdominal (PIA) (ou pressão intraperitoneal), pois estas evidências são necessárias para a compreensão do objeto do estudo.

No sistema cardiovascular ocorre uma atuação bimodal do pneumoperitônio, atuando de maneira diferente conforme PIA do gás dentro da cavidade abdominal (Perrin e Fletcher, 2004). Utilizando pressões menores que 10 mmHg pode ser observado o aumento do retorno venoso e aumento do débito cardíaco, o que pode ser explicado pelo mecanismo de Frank Starling, enquanto o retorno venoso aumenta pela compressão esplâncnica, efetuada pelo gás. O mecanismo de Frank Starlin está relacionado a adaptação do ventrículo a variações na pré-

carga, que responde adequando a pós-carga ao volume de sangue recebido. A utilização de pressões maiores que 10 mmHg podem ocasionar a compressão da veia cava inferior (caudal no caso dos animais domésticos), reduzindo o débito cardíaco. A compressão de artérias pode ocasionar o aumento da resistência vascular sistêmica (RVS), e, por conseguinte, da pressão sanguínea. Conforme se aumenta a PIA, há um aumento no trabalho cardíaco de modo compensatório, até o momento em que ocorre estase do sangue na veia cava, redução do retorno venoso, do débito cardíaco e da pressão sanguínea. A utilização de pressões iguais a 15 mmHg resultou em uma redução de até 28% do débito cardíaco em procedimentos videocirúrgicos realizados em humanos, através de Doppler transesofágico (Muralidhar, 2007), enquanto outros autores relacionaram uma queda de 15% no débito cardíaco e uma queda de 30% na pressão arterial média, utilizando a mesma pressão (Safran e Orlando, 1994). O resultado destas alterações cardiovasculares não compensadas resulta na queda da pressão arterial o que ocasiona a hipoperfusão dos órgãos, gerando dano por isquemia, e por conseguinte, reperfusão na desinsuflação.

O aumento da PIA também ocasiona efeitos relacionados a pressão intra-abdominal no sistema respiratório. A partir da insuflação da cavidade abdominal, pode-se observar o aumento da PIA, que promove a expansão do volume da cavidade abdominal, porém, a mesma pressão utilizada para vencer a resistência das camadas musculares do abdômen é aplicada no diafragma, diminuindo o volume da cavidade torácica, o que também altera o volume tidal (Deveney 2006), que compreende o volume de ar inalado e exalado sem esforço adicional. O aumento da pressão intra-abdominal também faz com que o abdômen ofereça uma resistência maior a expansão do diafragma, aumentando o esforço respiratório necessário para movimentar o diafragma (Safran e Orlando, 1994). A queda no volume tidal diminui o volume de ar

renovado nos alvéolos, o que pode comprometer o gradiente necessário para difusão de gases entre o alvéolo e o sangue.

Outros sistemas são afetados pelo aumento da pressão intra-abdominal, isto pode ocorrer de maneira direta, pelo aumento da PIA, ou indireta, através das alterações no sistema cardiovascular que resultam em diminuição da perfusão dos órgãos. Como efeito indireto do sistema cardiovascular, o sistema urológico tem o rim como principal alvo de alterações, resultando na redução da perfusão renal e taxa de filtração glomerular, resultado da vasoconstrição desencadeada pela compressão do parênquima renal e do ureter, compressão venosa, resposta simpática e sistema renina angiotensina (Diebel, 1998). O aumento na epinefrina circulante foi observado em animais submetidos a um modelo de aumento da resistência vascular periférica não invasiva (Julius et al., 1982), e pode resultar na liberação de renina, assim como a diminuição da perfusão renal. A diminuição da perfusão renal pode ocasionar hipóxia e isquemia, os quais são dois fatores primários para lesão renal, uma vez que as células do túbulo proximal e da Alça de Henle ascendente, parte espessa, são segmentos ativos com alta metabolização (Basile et al., 2014).

Diretamente relacionado ao aumento da PIA, ocorre a compressão dos órgãos abdominais e torácicos. O aumento da pressão intra-gástrica, associado ao aumento da pressão intratorácica (que efetua compressão esofágica), pode aumentar a ocorrência de refluxo (Safran e Orlando, 1994, Perrin e Fletcher, 2004). Ainda, o parênquima hepático é comprimido pela PIA associada a compressão da expansão torácica (pelo diafragma) porém isto não seria o suficiente para induzir lesão no parênquima hepático (Potter et al., 2006). A compressão de veias hepáticas foi capaz de reduzir em até 53% do fluxo hepático mensurado na veia porta de cães submetidos a pneumoperitônio utilizando pressão igual a 14 mmHg (Jakimowicz et al.,

1998), o que ocasionou disfunção hepática em porcos, quando comparados a um grupo submetido a cirurgia aberta (Tuñón et al., 1999). O aumento da PIA e o aumento da compressão venosa também resultam no aumento da pressão intracraniana. A compressão venosa causa o decréscimo do fluxo no plexo lombar e o aumento da pressão venosa no compartimento vascular do canal espinhal, aumentando a pressão intracraniana (Rosenthal et al., 1998).

3.5. Mecanismo de lesão na isquemia e reperfusão

A suscetibilidade celular à isquemia e reperfusão está relacionada a taxa metabólica e mecanismos adaptativos intrínsecos (Eltzschig e Collard, 2004), porém ocorre necrose, se o período de anóxia ou hipóxia severa é extenso. Os mecanismos de alteração celular e lesão na isquemia-reperfusão propostos por alguns autores (Kloner e Jennings 2001; Castro E Silva Jr et al., 2002; Eltzschig e Collard, 2004; Barbosa et al., 2006) foram esquematizados na Figura C.

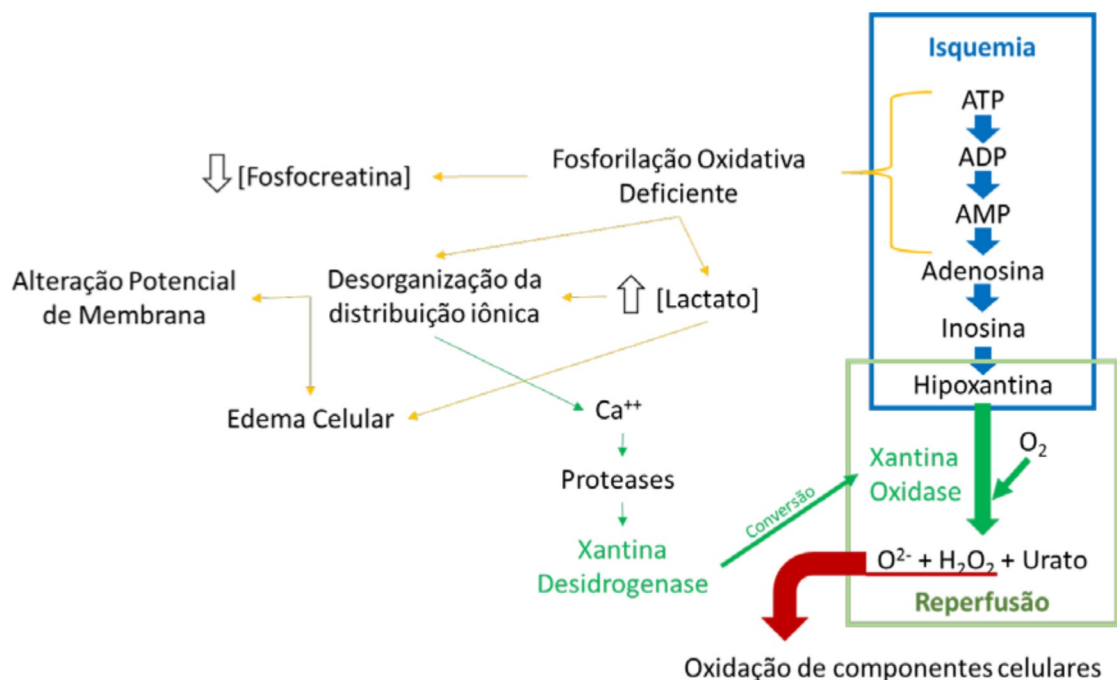


Figura C: Esquema dos mecanismos para geração de radicais livres de oxigênio, e de alterações celulares induzidas por isquemia-reperfusão.

É importante salientar que a lesão provocada por isquemia-reperfusão tem como componente a produção de espécies reativas de oxigênio (e de nitrogênio), podendo ser consideradas decorrente de estresse oxidativo; mas o estresse oxidativo não resulta, obrigatoriamente, em lesão. A definição atualizada de estresse oxidativo formulada por Sies e Jones (2007) é: Um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a uma interrupção da sinalização redox, controle, e/ou dano molecular.

O estresse oxidativo pode ser estudado através de uma ampla gama de metodologias que geralmente focam na mensuração de radicais livres, produtos da lesão por espécies reativas de oxigênio e níveis de antioxidantes totais ou específicos. Dentre as possibilidades, o teste para substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico, majoritariamente malondialdeído, expressa os níveis de subprodutos da peroxidação lipídica que reagem com o ácido tiobarbitúrico (Silva et al., 1999). As espécies reativas de oxigênio podem elevar a toxicidade do óxido nítrico sintetizado por enzimas, pois a reação entre estes resulta em compostos altamente tóxicos. Também é observado o aumento da atividade destas enzimas na situação de isquemia/reperfusão (Mete et al., 2017).

3.6. Estresse oxidativo e pneumoperitônio

Segundo os mecanismos de lesão do pneumoperitônio associados a isquemia-reperfusão, é possível gerar a hipótese de que os órgãos em que o retorno venoso ocorre através da veia cava inferior sofram estresse oxidativo após a isquemia e reperfusão associadas, respectivamente, ao pneumoperitônio e sua desinflação. Dentre as evidências deste mecanismo de lesão, já foram observadas alterações de biomarcadores em vários órgãos. A utilização de pneumoperitônio

com pressões maiores que 5 mmHg aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio no pulmão e no fígado (Sare et al., 2002); e aumentou níveis de malondialdeído (MDA) em intestino delgado (Kaya et al., 2002), rim (Akbulut et al., 2002) e ovário (Güven et al., 2010). Os níveis de MDA, estão associados a peroxidação lipídica, sendo este, considerado o aldeído de maior potencial mutagênico (Ayala, et al 2014), e a maior produção de espécies reativas de oxigênio constantemente ligada a períodos de isquemia e reperfusão, e responsáveis pelo dano molecular a lipídeos, proteínas e ácido desoxirribonucleico (Lodish et al., 2014).

3.7. Infertilidade e subfertilidade

A reprodução é algo natural para a maioria dos casais em todas as espécies, porém alguns indivíduos podem enfrentar dificuldades em atingir este objetivo. Quando isso ocorre, o indivíduo ou o par, podem ser considerados inférteis ou subférteis. Segundo Zegers-Hochschild e colaboradores (2009), que revisaram o glossário de termos utilizados em tecnologias de reprodução assistida, a infertilidade pode ser definida como a incapacidade de um casal, não utilizando métodos contraceptivos, de atingir uma gravidez clínica durante o período de um ano. Enquanto a subfertilidade pode ser conceituada como qualquer forma de fertilidade reduzida resultando em um tempo prolongado de não-concepção indesejada (Gnoth et al., 2005). Uma revisão sistemática realizada com o objetivo de verificar a prevalência da infertilidade pelo mundo, demonstrou que aproximadamente 20 a 30% dos casos de infertilidade podem ser atribuídos aos homens, enquanto outros 20 a 30 % são resultantes do casal, sendo o restante, 50% dos casos, atribuídos às mulheres (Agarwal et al., 2015), aproximadamente 30 milhões de homens apresentariam infertilidade, onde está infertilidade masculina seria classificada após o exame do casal com problemas encontrados somente no homem. As causas de infertilidade masculina podem estar associadas a problemas na produção

de espermatozoides ou no transporte dos espermatozoides, problemas hormonais, problemas sexuais (ereção e ejaculação) e anticorpos contra os espermatozoides.

3.8. Lesão testicular e alterações na fertilidade

Conforme revisado por Reyes et al., (2012), a hipóxia está relacionada à mais de uma causa de infertilidade masculina, a infertilidade em humanos caracteriza-se geralmente por apresentam baixa contagem espermática, motilidade e níveis de testosterona. Em roedores as alterações são: células de Sertoli vacuolizadas, diminuição e picnose nas células germinativas, ingurgitamento dos vasos sanguíneos, diminuição no número de células de Leydig, e alteração nos níveis de testosterona. A suscetibilidade dos testículos a hipóxia é exacerbada pela baixa tensão de oxigênio nos túbulos seminíferos, inclusive, a tensão de oxigênio no túbulo seminífero é 20% menor que no interstício testicular (Free et al., 1976). É esperado que a tensão de oxigênio no túbulo seminífero seja afetada por duas condições, baixo O₂ atmosférico (hipóxia) e fluxo sanguíneo reduzido (torsão testicular e varicocele) (Reyes et al., 2012). A varicocele, dilatação exacerbada do plexo pampiniforme, reduz o fluxo sanguíneo testicular significativamente, e através da falha no suprimento do metabolismo do epitélio germinativo, prejudica a espermatogênese (Tarhan et al., 2003). Ademais, conforme ocorre em órgãos posicionados dentro do abdômen e drenados pela veia cava inferior, é possível que o fluxo sanguíneo testicular esteja reduzido, uma vez que é drenado pela veia testicular, que se liga diretamente a veia cava inferior.

O dano histológico testicular pode ser mensurado através de várias formas, porém, sistemas de pontuação foram desenvolvidos para facilitar a comparação e promover a uniformização dos trabalhos. Entre outros, podemos citar os sistemas de pontuação de Johnsen (1970) e de Cosentino et al. (1986), o primeiro se baseia na presença das células que compõem o testículo,

e sua quantidade, sendo que a maior nota é atribuída a arquitetura normal, e a menor nota é atribuída a ausência de célula no corte histológico do túbulo seminífero; o segundo é formado pelas características presentes no epitélio do túbulo seminífero, como: variação na ordenação, presença de descamação, alteração nos núcleos celulares, presença de necrose, compactação do túbulo seminífero, sendo que a arquitetura normal ganha a menor nota, e a presença de necrose a maior nota (Manuscript, Figure 1, p. 43).

4. OBJETIVOS

Geral:

- O objetivo é analisar a literatura, através de uma revisão sistemática, para avaliar o efeito de expor da exposição de animais saudáveis à diferentes configurações de pneumoperitônio, sobre parâmetros de biomarcadores de estresse oxidativo e histologia testicular.

Específicos:

- Reunir evidencias de alterações histológicas e estresse oxidativo no testículo, interpretando à luz da PIA e do tempo de exposição.
- Encontrar uma configuração para utilização de pneumoperitônio que não resulte em alteração testicular.
- Avaliar a aplicação de resultados em pacientes humanos e animais domésticos.
- Gerar soluções posteriores às deficiências encontradas nesta metodologia.

5. Manuscrito

Um sumário deste manuscrito foi submetido à uma avaliação preliminar do editor da Revista Urology, este demonstrou interesse emitindo um convite formal para sua submissão do manuscrito.

Pneumoperitoneum effect on testicular oxidative stress and histopathology – Systematic Review.

Submetido na Revista Urology (CBII = B1).

Pneumoperitoneum effect on testicular oxidative stress and histopathology – Systematic Review.

Bruno Albuquerque de Almeida^a, Vanessa Milech^b, Maurício Veloso Brun^c, Antonio Sergio Varela Junior^d, Carine Dahl Corcini^{e*}.

a. Master's Degree in Physiological Sciences, Federal University of Rio Grande (FURG), CEP: 96203-900, Rio Grande, RS, Brazil.

b. Master's Degree in Veterinary Medicine, Federal University of Santa Maria (UFSM), CEP: 97.105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

c. Adjunct Professor, Department of Small Animal, Rural Sciences Center – UFSM. Research Fellow of CNPq - Brazil (308019/2015-6; 200346/2017-2).

d. Professor, Institute of Biological Sciences – FURG. Research Fellow of CNPq - Brazil (307195 2015-7).

e. Adjunct Professor, Department of Animal Pathology, Faculty of Veterinary, Federal University of Pelotas, CEP: 96160-000, Pelotas, RS, Brazil. Research Fellow of CNPq - Brazil (306356 2014/7) (Corresponding author: e-mail corcinicd@gmail.com, cell phone +55 53 9976-8129).

Keywords: testis, intra-abdominal pressure, injury, laparoscopy.

Abstract word count: 100 words

Manuscript text word count: 2188 words

Funding: This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Process numbers on affiliation.

Declarations of interest: none

Acknowledgements: The study was edited to ensure that the language is clear and free of errors by Editage.

5.1.ABSTRACT

To analyze the effect of exposing healthy animals to different pneumoperitoneum settings by assessing oxidative stress and testicular histopathology, a systematic search was carried out in three databases, using terms: pneumoperitoneum AND testi* or gonad. The survey yielded 2209 scientific articles. After applying criteria, six selected articles addressed pneumoperitoneum effects on testicular structure and used scoring system to perform histopathological evaluation. Three studies verified the occurrence of changes in oxidative stress. According to this review, pneumoperitoneum used at intra-abdominal pressures ≥ 9 mmHg caused testicular histological damage, and pressures ≥ 10 mmHg were sufficient to cause testicular oxidative stress in healthy animals.

5.2.INTRODUCTION

Pneumoperitoneum is the presence of gas in the abdominal cavity. This can occur as a pathological condition starting from visceral perforation and other thoracic, abdominal, and gynecological causes.¹ However, it is also used for creating space in the abdominal cavity for surgical procedures using video laparoscopy.² It is necessary to understand the physiologic alterations provoked by pneumoperitoneum and its possible risks with the intention of minimizing harmful effects.

Physiological changes caused by pneumoperitoneum include inflammatory, structural changes in the peritoneum, which may reduce the capacity to protect against microorganisms, their products and components, and cardiovascular/hemodynamic, acid-base, and respiratory effects.² The hemodynamic effects of pneumoperitoneum are associated with intra-abdominal pressure (IAP) used in insufflation and results in the reduction of blood flow to the organs because of the relationship between increasing IAP, greater compression of the vena cava followed by venous blood damping, and a decrease in cardiac output.³ The mechanisms of tissue injury following ischemia involve the reduction of blood and nutrient supply; reduced withdrawal of metabolic products;⁴ increased capillary extravasation and leukocyte diapedesis; and the release of inflammatory mediators by the endothelium with stimulation of cellular local response.⁵ Reperfusion-induced damage is caused by an imbalance between free radical production and antioxidant defense system capacity.⁶

Cellular lesion propagation is associated with the magnitude and duration of tissue ischemia⁴, which is associated with the level of vena cava compression; blood flow stasis caused by the IAP; and time of exposure (TE) to pneumoperitoneum. In minimally invasive therapeutic and exploratory procedures, pressure is chosen according to operative volumetric needs,⁷ allowing for the visualization and manipulation of abdominal cavity structures.

Optimal pneumoperitoneum configuration can be chosen based on the knowledge of the harmful effects. The objective of this systematic review was to analyze the effect of exposing healthy animals to different configurations of pneumoperitoneum on evaluating oxidative stress biomarkers and testicular histology.

5.3.MATERIAL AND METHODS

5.3.1. Search strategy

We did a systematic search for publications in three databases. The search was performed on March 20, 2017 in English without time restriction. The databases used were PubMed, ScienceDirect, and Web of Science. Full scientific articles found were assessed for their relevance to this study. The terms structure used for the search were:

- (pneumoperitoneum) AND (testi* OR gonad)

5.3.2. Selection of Studies

Two independent reviewers (BAA and VM) selected studies using the title, abstract, keywords, or full text by applying inclusion and exclusion criteria. Any differences were resolved through a discussion with a third reviewer (CDC).

5.3.3. Inclusion and Exclusion Criteria

Inclusion criteria were (1) fully published in peer-reviewed journals; (2) using animal models; (3) comparing groups of animals exposed to pneumoperitoneum with an unexposed group; (4) results of the testicular damage were measured using the Cosentino ⁸ or Johnsen ⁹ scoring system and performed by optical microscopy; (5) or testicular oxidative stress was assessed by free radical direct measurement, and products of damage by reactive oxygen species, or specific or total antioxidant levels, without technical restriction. The exclusion

criteria were (1) the non-applicability of inclusion criteria on the study, and (2) study's in other languages.

5.4.RESULTS

A total of 2734 results were found in the databases. There were 113 from PubMed, 2574 from ScienceDirect, and 47 from Web of Science publications included. Subsequently, 2209 publications remained after publications that were not complete scientific articles or duplicate items were excluded. Six full-text papers were selected after applying inclusion and exclusion criteria.

The Studies used carbon dioxide pneumoperitoneum to produce abdominal cavity insufflation, however this information was not found in Aydin *et al.*¹⁰ Procedures were performed on pigs after preanesthetic medication with ketamine and xylazine, induction with propofol, and maintenance of inhalation anesthesia with the use of sevoflurane¹¹ and in rats after general injectable anesthesia with ketamine hydrochloride and xylazine.^{10, 12, 13, 14}

5.4.1. Testicular histopathology

All six articles used at least one scoring system (Figure 1) for testicular histopathological evaluation and to address the effects of pneumoperitoneum on testicular structure. The articles are summarized in Table 1, showing their respective scores of histological damages, TE and IAP.

Ribeiro *et al.*¹⁵ observed a decrease in diameter of the seminiferous tubules in the 8 mmHg group when using light microscopy. The studies of İmamoğlu *et al.*¹³ and Ribeiro *et al.*¹⁵ extended the interval between disinflation and sampling time for histological evaluation and oxidative stress. Samples were collected six weeks after pneumoperitoneum exposure, unlike in other studies where material was collected after disinflation.^{10, 11, 12, 14}

5.4.2. Testicular oxidative stress

Three studies found changes in testicular oxidative stress in animals exposed to pneumoperitoneum. İmamoğlu *et al.*¹² investigated levels of malondialdehyde (MDA) to estimate testicular tissue lipid peroxidation. The testes of the 10 mmHg and 20 mmHg groups presented higher levels of MDA compared to the control group. Using immunohistochemistry, Istanbuluoglu *et al.*¹¹ observed an increase in nitric oxide-producing enzymes (induced and endothelial) in animal testes that underwent 20 mmHg of IAP. The study conducted by Rifaioğlu *et al.*¹⁴ revealed the oxidative and total antioxidant (TOS and TAS) conditions of animals exposed to pneumoperitoneum, where the control group showed the highest TAS and lowest TOS while the PNP group with 15 mmHg showed the lowest TAS and the highest TOS.

5.5.DISCUSSION

The terms structure and inclusion criteria used in this study were broad, although there were defined histopathology scoring systems for inclusion in this systematic review. The Johnsen and Cosentino scores were chosen after an initial search because its use was observed in journal articles included in the literature review. Nevertheless, it was impossible to perform a meta-analysis due to the small number of heterogeneous sample papers.

Using the information obtained from samples collected after testicular deflation and histological analysis (Table 1), it was observed that pressures equal to, or higher than, 9 mmHg resulted in a greater degree compared to control, according to Cosentino lesion scores. Using the Johnsen score, Istanbuluoglu *et al.*¹¹ found no difference between the groups even when using an IAP and an TE higher than those of Rifaioğlu *et al.*,¹⁴ in which the group exposed to pneumoperitoneum differed from the control group. The study results of Istanbuluoglu *et al.*¹¹ may be explained by possible germ cell permanence in the injured testis after immediate disinflation because İmamoğlu *et al.*¹³ observed a marked fall in the Johnsen score in samples

collected six weeks after pneumoperitoneum induction using the same IAP at a lower TE. Species-specific factors and different anesthetic protocols may explain the varied results found by Istanbuluoglu *et al.*¹¹ and Rifaioğlu *et al.*¹⁴. The first study was conducted on pigs while the second was conducted on rats. It is known that some drugs, such as ketamine, may induce anti-inflammatory activity, possibly conferring a protective effect on other organs, like rat intestines,¹⁶ against ischemic-reperfusion injuries.

Testicular tissue changes were not observed in short (6 mmHg)¹⁰ and long-term (8 mmHg)¹⁵ at pressures equal to, or lower than 8 mmHg. A pressure of 6 mmHg may be insufficient to perform minimally invasive procedures in small animals, where an IAP between 8 and 12 mmHg is usually used. This is even lower than the 15 mmHg pressure used in humans due to the thinness of the abdominal wall¹⁷, resulting in lower compliance. The absence of changes in Johnsen scores in samples collected after 6 weeks of exposure to pneumoperitoneum¹⁵ may be indicative of germ cell restocking in the seminiferous tubules after injury since the mouse spermatogenic cycle is 48 to 52 days¹⁸, rather than lack of injuries. Ribeiro *et al.*¹⁵ analyzed long-term studies and differed from Imamoglu *et al.*¹³ because their study not show testicular lesions. However, ischemic magnitude may explain the differences in results considering that the IAPs and TEs used by Ribeiro *et al.*¹⁵ were smaller. Seminiferous tubule lumen reductions observed by Ribeiro *et al.*¹⁵ may correspond to histological findings of graduation 2 of the Cosentino score. In addition, the compactness of the seminiferous tubules was analyzed based on their diameters. Based on these observations, it is suggested that an in-depth study on pneumoperitoneum using smaller IAP and with a similar TE be performed. It is also suggested that the Cosentino and Johnsen scoring systems be used to analyze short and long-term effects.

It is possible to estimate the damage caused by testicular blood flow occlusion and reperfusion through techniques such as 720° torsions or spermatic cord clamping. The Johnsen scores of the clamp group, applied for 1 hour, were lower than the short-term control group (4 hours after reperfusion, mean 4.6 ± 2.1),¹⁹ and long-term group (6 months after the procedure, mean 6.87 ± 0.37).²⁰ The results found by *Al-Maghrebi et al.*²⁰ were similar to observations by *İmamoğlu et al.*,¹³ who evaluated a group after six weeks following the application of an IAP of 20 mmHg. These findings suggest that there is a point where the magnitude of injury established through the pneumoperitoneum, caused by a high IAP, appears to be similar to total occlusion of the testicular blood flow. However, the damage caused by short-term spermatic cord clamping is greater than any pneumoperitoneum configuration found in the studies, and could be greater than damages found in animals exposed to 20 mmHg, which could explain similar morphological changes at different time points.

Only a few studies evaluated testicular oxidative stress, and these do not include IAPs less than 10 mmHg. In general, alterations were found in animals exposed to pneumoperitoneum with the pressures used (10, 15 and 20 mmHg) compared to controls. The study by *İmamoğlu et al.*¹² demonstrated an increase in MDA levels, similar to those found in total testicular torsion occlusion in other studies.^{20,21} According to *İmamoğlu et al.*¹³, testicular tissue is highly sensitive to ischemia and can become hypoxic even after short-term microcirculatory disorders, leading to reduced tissue oxygenation, cell metabolism, acidosis, and the production of reactive oxygen species. Furthermore, *Istanbulluoglu et al.*¹¹ believe that reactive oxygen and nitrogen species are important mediators of ischemia-induced damage to tissues, and nitric oxide is a potent biological mediator that functions as a signal in physiological conditions. However, it can cause DNA damage and cell death in high concentrations. Nitric

oxide-forming enzymes also showed an increase in concentration ²² in animals submitted to testicular torsion of 720 ° for 1 hour, as observed by Istanbuluoglu *et al.* ¹¹

Although it was not the purpose of the study to examine the attenuate techniques for testicular damage during pneumoperitoneum, preconditioning studies of pneumoperitoneum were not found. Preconditioning uses brief exposure to IAP prior to the main procedure, where animals subjected to pneumoperitoneum carried out with pressure of 15 mmHg and TE of 1 hour showed lower degrees of ovarian lesions when compared to animals without preconditioning. ²³ Preconditioning the pneumoperitoneum can be an alternative for situations that require the highest IAPs, which result in testicular damage.

5.6. CONCLUSIONS

According to this literature review, pneumoperitoneum used at pressures equal to, or greater than, 9 mmHg caused the testicles to exhibit histological damages. In addition, pressures greater than 10 mmHg are sufficient to cause testicular oxidative stress, according to the biomarkers used in some included studies. However, oxidative stress evaluations were not observed in pneumoperitoneum at pressures lower than 8 mmHg.

5.7. REFERENCES

1. Čečka F, Sotona O, Šubrt Z, 2013. How to distinguish between surgical and non-surgical pneumoperitoneum. *Signa Vitae*. 2013; 9, 1-7.
2. Avtan L. Creating the Pneumoperitoneum. In: Avci C, Schiappa JM. (Ed.). *Complications in Laparoscopic Surgery: A Guide to Prevention and Management*. New York, NY: Springer International Publishing; 2016; 1-16.

3. Deveney KE. Pulmonary Implications of CO₂ Pneumoperitoneum in Minimally Invasive Surgery. In: Whelan RL, Fleshman Jr JW, et al. (Eds.). *The Sage Manual: Perioperative Care in Minimally Invasive Surgery*. New York, NY: Springer; 2006; 360-365.
4. Kalogeris T, Baines CP, Krenz M, Korthuis RJ. Cell biology of ischemia/reperfusion injury. *Int Rev Cell Mol Biol*; 2012; 298, 229-317.
5. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J. Pathol*; 2000; 190, 255-66.
6. Sammour T, Mittal A, Loveday BP, Kahokehr A, Phillips AR, Windsor JA, Hill AG. Systematic review of oxidative stress associated with pneumoperitoneum. *Br. J. Surg*; 2009; 96, 836-50.
7. Swanstrom LL. Cardiovascular Effects of CO₂ Pneumoperitoneum. In: Whelan RL, Fleshman JW, Fowler DL. (Eds.), *The Sage Manual: Perioperative Care in Minimally Invasive Surgery*. Springer, New York; 2006; 355-359.
8. Cosentino MJ, Nishida M, Rabinowitz R, Cockett AT. Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various durations of spermatic cord torsion. *J. Androl*; 1986; 7, 23-31.
9. Johnsen SG. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. *Hormones*; 1970; 1, 2-25.
10. Aydin HR, Kesici S, Kesici U, Saygin I, Ulusoy H, Imamoglu M, Deger O. Effects of different intra-abdominal pressure values on different organs: what should be the ideal pressure. *Eur Surg*; 2014; 46, 203-208.

11. Istanbulluoglu MO, Piskin M, Zor M, Celik A, Ozgok A, Ates M, Ustun H, Ozgok Y. The Acute Effects of Increased Intra-abdominal Pressure on Testicular Tissue: An Experimental Study in Pigs. *Urology*; 2011; 77, 510-516.
12. Imamoğlu M, Cay A, Unsal MA, Aydin S, Ozdemir O, Karahan C, Sari A, Sarihan H. The effects of increased intraabdominal pressure on testicular blood flow, oxidative stress markers, and morphology. *J. Pediatr. Surg*; 2006; 41, 1118-24.
13. Imamoğlu M, Sapan L, Tekelioğlu Y, Sarihan H. Long-Term Effects of Elevated Intra-Abdominal Pressure on Testes An Experimental Model of Laparoscopy. *Urology Journal*; 2013; 10, 953-959.
14. Rifaioğlu MM, Davarci M, Nacar A, Alp H, Celik M, Sefil NK, Inci M. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects against acute urogenital injury following pneumoperitoneum in the rat. *Ren. Fail.*; 2014; 36, 98-103.
15. Ribeiro CT, De Souza DB, Medeiros Jr JL, Costa WS, Pereira-Sampaio MA, Sampaio, FJB. Pneumoperitoneum induces morphological alterations in the rat testicle. *Acta. Cir. Bras.*; 2013; 28, 419-422.
16. Guzmán-De La Garza FJ, Cámara-Lemarrooy CR, Ballesteros-Elizondo RG, Alarcón-Galván G, Cordero-Pérez P, Fernández-Garza NE. Ketamine reduces intestinal injury and inflammatory cell infiltration after ischemia/reperfusion in rats. *Surgery Today*; 2010; 40, 1055–1062
17. Brun MV. Acesso a Cavidade Peritoneal. In: Brun MV (Ed.), *Videocirurgia em Pequenos Animais*: Rio de Janeiro, RJ: Roca; 2015; 99-112.

18. De Kretser DM. The testis. In: Austin CR, Short RV (Eds.). *Reproduction in Animals*. New York: Cambridge University Press; 1982; 76-90.
19. Al-Maghrebi M, Renno WM, Al-Ajmi N. Epigallocatechin-3-gallate inhibits apoptosis and protects testicular seminiferous tubules from ischemia/reperfusion-induced inflammation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 2012; 420, 434-439.
20. Al-Maghrebi M, Kehinde EO, Anim JT. Long term testicular ischemia-reperfusion injury-induced apoptosis: involvement of surviving down-regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*; 2010; 395, 342-347.
21. Yurtçu M, Abasiyanik A, Avunduk MC, Muhtaroglu S. Effects of melatonin on spermatogenesis and testicular ischemia-reperfusion injury after unilateral testicular torsion-detorsion. *J. Pediatr. Surg.*; 2008; 43, 1873-1878.
22. Mete, F., Tarhan, H., Celik, O., Akarken, I., Vural, K., Ekin, R.G., Aydemir, I., Ilbey, Y.O., 2017. Comparison of intraperitoneal and intratesticular ozone therapy for the treatment of testicular ischemia-reperfusion injury in rats. *Asian J. Androl.* 19, 43-46.
23. Biler, A., Yucebilgin, S., Sendag, F., Akman, L., Akdemir, A., Ates, U., Uyanikgil, Y., Yilmaz-Dilsiz, O., Sezer, E., 2014. The effects of different intraabdominal pressure protocols in laparoscopic procedures on oxidative stress markers and morphology in rat ovaries. *Adv. Clin. Exp. Med.* 23, 885-892.

Table 1 – Summary of the selected studies with pneumoperitoneum TE, IAP and histological degree of injury findings.

Author	Pneumoperitoneum		Histological degree of injury			
	TE (h)	IAP (mmHg)	Cosentino (Median)		Johnsen (Mean)	
Aydin <i>et al.</i> ¹⁰	1	Control	1 (1-1)			
		6	1 (1-2)			
		9	2 (1-2)*			
		12	2 (1-2)*			
Imamoglu <i>et al.</i> ¹²	1	Control	1 (1-1)	1 (1-1)		
		10	2 (2-2)*	2 (2-3)*		
		20	2 (2-3)*	2 (2-3)*		
Imamoglu <i>et al.</i> ¹³	1	Control	1 (1-1)	1 (1-1)	9.9±0.4	9.8±0.5
		10	2 (1-2)*	2 (1-2)*	7.9±0.8*	8±0.8*
		20	3 (2-3)*	3 (2-3)*	6.3±0.4*	6.8±1.0*
Istanbulluoglu <i>et al.</i> ¹¹	4	Control	10±0			
		20	8.66±0.8			
Ribeiro <i>et al.</i> ¹⁵	3	Control	8.2±0.4			
		8	8.4±0.4			
Rifaioglu <i>et al.</i> ¹⁴	1	Control	10			
		15	9*			

* Groups that differed from their control, in the same column. IAP – Intra-abdominal pressure; TE – Time of exposure.

Figure 1 –Cosentino and Johnsen histological degree criteria.

Cosentino graduation ⁸		Johnsen graduation ⁹	
1	Normal testicular architecture with an orderly arrangement of germinal cells.	10	Complete spermatogenesis. Germinal epithelium organized in a regular thickness leaving an open lumen.
		9	Many spermatozoa present but germinal epithelium disorganized, with marked sloughing or obliteration of the lumen.
2	Less orderly and noncohesive germinal epithelium and packed seminiferous tubules.	8	Only a few spermatozoa
3	Disordered sloughed germinal cells with shrunken pyknotic nuclei and less distinct seminiferous tubule borders	7	No spermatozoa but many spermatids present.
		6	No spermatozoa and only a few spermatids.
4	Seminiferous tubules that were packed with coagulative necrosis of the germinal epithelium.	5	No spermatozoa and spermatids but spermatocytes present.
		4	No spermatozoa and spermatids but few spermatocytes
		3	Only spermatogonia present.
		2	Only Sertoli cells present.
		1	No cells in tubular cross-section,

6. DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

O nosso trabalho pôde reunir diversas evidências de que ocorre estresse oxidativo e dano lesão testicular em animais submetidos a pneumoperitônio utilizando PIA maiores. No entanto, devido a heterogeneidade dos trabalhos, foi impossível realizar uma meta-análise, de maneira a avaliar o efeito resultante do pneumoperitônio. Pelo mesmo motivo, a interpretação dos resultados a luz da medicina humana é difícil, devido as variações metodológicas (sobre todas, as espécie-específicas). Embora a utilização de animais aproxime os resultados com a medicina veterinária, é difícil transpor as evidências relacionadas ao padrão de configuração do pneumoperitônio, da mesma forma que ocorre em humanos, gerando diversas dúvidas sobre a utilização do pneumoperitônio com os pacientes.

Diante do trabalho, fica evidente a dificuldade em se avaliar os efeitos do pneumoperitônio em pacientes humanos ou animais, devido ao caráter invasivo das metodologias necessárias para se avaliar a citologia testicular. Em animais que estes procedimentos são mais comumente realizados (cães e gatos), ainda é possível sugerir a castração após procedimentos videoassistidos como uma forma de avanço no conhecimento dos efeitos do pneumoperitônio no ambiente testicular; porém, ainda assim, o procedimento cirúrgico poderia ficar exageradamente longo, pois iria incluir o procedimento específico realizado com pneumoperitônio (com tempo definido), tempo de reperusão após a desinsuflação e mais o tempo de castração.

Para sanar as dúvidas resultantes do trabalho seria necessária uma metodologia não invasiva para ser utilizada em pacientes humanos, que ainda poderia ser aplicada no estudo dos pacientes animais. Como forma alternativa, e baseado nos resultados encontrados em literatura pelo nosso trabalho, poderíamos sugerir a utilização do espermograma em ejaculado destes pacientes, essa abordagem traz como vantagem uma avaliação seriada, na qual poderiam ser

observados os efeitos imediatos, e após várias semanas, de procedimento. Baseado nos resultados do escore de Johnson (Imamoglu et al., 2006) é possível esperar um decréscimo na quantidade de espermatozoides a longo prazo após o procedimento, porém, os resultados a curto prazo seriam imprevisíveis, uma vez que as células espermáticas colhidas após o procedimento seriam provenientes do epidídimo, o que pode gerar um decréscimo gradativo após a primeira coleta. Embora não seja objeto de estudo, a utilização desta metodologia alternativa ainda poderia auxiliar a medicina a compreender o tempo total de alteração na fertilidade destes pacientes, observando não só o decréscimo da quantidade e qualidade, como também sua recuperação. Através do espermograma seriado seria possível definir qual a PIA que não causa dano as células espermáticas, ou alteração na fertilidade masculina.

7. CONSIDERACOES FINAIS

Esta dissertação teve como objetivo analisar a literatura para avaliar o efeito de expor animais saudáveis a diferentes configurações de pneumoperitônio, através da avaliação de estresse oxidativo e histopatologia testicular. De acordo com nossos resultados, o pneumoperitônio utilizando PIA, iguais a, ou maiores que 9 mmHg causaram lesão testicular, verificada através de avaliação histológica. PIA maiores que 10 mmHg foram suficientes para causar estresse oxidativo testicular, o qual não foi observado utilizando PIA igual a, ou menor que, 8 mmHg. Em discussão, os resultados de difícil aplicação a rotina clínico cirúrgica (humana e animal) devido sua heterogeneidade, puderam gerar uma metodologia alternativa para acessar as alterações testiculares de maneira não invasiva e definitiva em medicina humana e animal. Esta dissertação pode reunir os trabalhos que pesquisaram os efeitos do pneumoperitônio em testículos de animais saudáveis, no qual puderam ser observados diferentes níveis de lesão e a existência de estresse oxidativo, porém, estes resultados só poderão ser aplicados a rotina clínico cirúrgica, quando sustentados por uma metodologia alternativa específica a espécie de estudo.

8. BIBLIOGRAFIA GERAL

AGARWAL, A. et al. A unique view on male infertility around the globe. **Reproductive Biology and Endocrinology**. v. 13, n. 37, p. 1-9, 2015.

AGHA, R.; MUIR, G. Does laparoscopic surgery spell the end of the open surgeon?. **Journal of the Royal Society of Medicine**. v. 96, n. 11, p. 544-546, 2003.

AKBULUT, G. et al. Changes in tissue-oxidative stress markers in an experimental model of laparoscopic donor nephrectomy. **Transplantation**. v. 74, p. 1768–1772, 2002.

AYALA, A. et al. Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v.2014, p.31 2014.

BARBOSA, L.F. et al. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**. v. 29, n. 6, p. 1352-1360, 2006 .

BASILE, D.P. et al. Pathophysiology of Acute Kidney Injury. **Comprehensive Physiology**. v. 2, n. 2, p. 1303-1353, 2012.

BROKELMAN, W.J.A. et al. Peritoneal changes due to laparoscopic surgery. **Surgical Endoscopy**. v. 25, n. 1, p. 1-9, 2011.

BRUN, M. V. Acesso a Cavidade Peritoneal. em: M. V. Brun (1º Ed.). **Videocirurgia em Pequenos Animais**: Editora Roca, p. 99-112, 2015.

CASTRO E SILVA JR., O. et al. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirurgica Brasileira**. v.17, n. 3, p. 96-100, 2002.

COSENTINO, M.J. et al.. Histopathology of prepubertal rat testes subjected to various durations of spermatic cord torsion. **Journal of Andrology**; v.7, p. 23-31, 1986.

DEVENEY, K.E. Pulmonary implications of CO₂ pneumoperitoneum in minimally invasive surgery. In: WHELAN RL et al., editors. em: **The Sages Manual of Perioperative care in minimally invasive surgery**. Springer New York: Springer Science and Business Media Inc. p. 360–5, 2006.

DIEBEL, L.N. Renal Function and Circulation under the Influence of Pneumoperitoneum, em: ROSENTHAL, R.J. et al. **The Pathophysiology of Pneumoperitoneum**. Berlin. Springer, p. 62-69, 1998.

FREE. M. J. et al. Respiratory gas tensions in tissues and fluids of the male rat reproductive tract. **Biology of Reproduction**, v. 14, n. 4, p. 481–488, 1976.

GLASGOW, R.E. et al. The benefits of a dedicated minimally invasive surgery program to academic general surgery practice. **Journal of gastrointestinal**. v. 8, n. 7, p. 869-73, 2004.

GNOTH, C. et al. Definition and prevalence of subfertility and infertility. **Human reproduction**. v. 20, n. 5, p. 1144-7, 2005.

IMAMOĞLU, M. et al. The effects of increased intraabdominal pressure on testicular blood flow, oxidative stress markers, and morphology. **Journal of Pediatric Surgery**. v. 41, p. 1118-24, 2006.

JOHNSEN, S.G. Testicular biopsy score count--a method for registration of spermatogenesis in human testes: normal values and results in 335 hypogonadal males. **Hormones**; v.1, p. 2-25, 1970.

JULIUS, S. et al. Sustained blood pressure elevation to lower body compression in pigs and dogs. **Hypertension**. v. 4, p. 782-788, 1982.

JAKIMOWICZ, J. Laparoscopic insufflation of the abdomen reduces portal venous flow. **Surgical endoscopy**. v. 12, n. 2, p. 129-32, 1998.

KAYA, Y. et al. Abdominal insufflation–deflation injury in small intestine in rabbits. **European Journal of Surgery**. v. 168, p. 410–417, 2002.

LACY, A. et al. Alternative Gases in Laparoscopic Surgery. em: Rosenthal, R.J. et al. **The Pathophysiology of Pneumoperitoneum**. Sprin

LODISH, H. et al. **Biologia Celular e Molecular** - 7ed. Artmed Editora, 2014. ISBN 9788582710500.ger, Berlin, 1998.

METE, F. et al. Comparison of intraperitoneal and intratesticular ozone therapy for the treatment of testicular ischemia-reperfusion injury in rats. **Asian Journal of Andrology**. v. 19, p. 43-46. 2017.

MULARSKI, R.A. et al. Nonsurgical causes of pneumoperitoneum. **Western Journal of Medicine**. v. 170, n. 1, p. 41-46, 1999.

MURALIDHAR. V. Physiology of pneumoperitoneum and anaesthesia in laparoscopic surgery. Deshpande Suresh. **Comprehensive laparoscopic surgery**. p. 49-52, 2007.

PERRIN, M.; FLETCHER, A. Laparoscopic abdominal surgery. **Continuing Education in Anaesthesia, Critical Care & Pain**. v. 4, n. 4, p. 107–110, 2004.

REYES, J.G. et al. The Hypoxic Testicle: Physiology and Pathophysiology. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**., v. 2012, p. 1-15, 2012.

ROSENTHAL, R.J. et al. Intra-abdominal Pressure, Intracranial Pressure, and Hemodynamics: A Central Nervous System-Regulated Response. em: Rosenthal, R.J. **The Pathophysiology of Pneumoperitoneum**. Springer Berlin Heidelberg. p. 85-98, 1998.

SAFRAN, D.B.; Orlando, R. Physiologic effects of pneumoperitoneum. **American journal of surgery**. v. 167, n. 2, p. 281-6, 1994.

SARE, M. et al. Effects of carbon dioxide pneumoperitoneum on free radical formation in lung and liver tissues. **Surgical Endoscopy**. v. 16, p. 188–192, 2002.

SIES, H.; JONES, D. Oxidative stress. em: Fink, G. **Encyclopedia of Stress**, Elsevier, Amsterdam. p. 45–48, 2007.

SILVA, F.A.M et al. Métodos para Avaliação do Grau de Oxidação Lipídica e da Capacidade Antioxidante. **Química Nova**, v.22, n.1, 1999.

TARHAN, S. et al. Effect of varicocele on testicular artery blood flow in men-color Doppler investigation. **Scandinavian Journal of Urology**. v. 37, n. 1, p. 38-42, 2003.

TUNON, M.J. et al. Liver blood flow changes during laparoscopic surgery in pigs. A study of hepatic indocyanine green removal. **Surgical endoscopy**. v.13, n. 7, p. 668-72, 1999.

ZEGERS-HOCHSCHILD, F. et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care. **Fertility and Sterility**. v. 108, n. 3, p. 393-406, 2017.