



Inducción de empiema en ratones a través de la inoculación pleural de bacterias

DRES. JOSÉ CARLOS FRAGA¹, SÉRGIO L. AMANTÉA², RODRIGO ARGENTA³, LEANDRO MOURA³, CLAUDIO NHUCH³, SANDRA BOROWSKI⁴

Resumen

Objetivo: evaluar la inducción experimental de empiema en ratones, a través de la inoculación de dos bacterias (*Pasteurella multocida* y *Staphylococcus aureus*) utilizando técnica quirúrgica simple o de fácil ejecución.

Método: fueron utilizados 24 ratones albinos de la raza Wistar, de ambos sexos, pesando entre 250 y 300 gramos, que luego de la anestesia general fueron sometidos a toracotomía anterior derecha, alejamiento de la musculatura e inoculación de 0,2 ml de solución, de acuerdo a la siguiente descripción: grupo I (n=12), inoculación de *Pasteurella multocida*, 10¹⁰ unidades formadoras de colonia/ml cultivados en caldo cerebro-corazón; grupo II (n=8) inoculación de *Staphylococcus aureus*, 10¹⁰ unidades formadoras de colonia/ml cultivados en caldo cerebro-corazón, y grupo III (n=4); inoculación de caldo de cerebro-corazón estéril (control). Los animales fueron sacrificados en hasta 7 días, y la intensidad de la reacción pleural fue analizada microscópicamente de acuerdo a escala estandarizada.

También se evaluaron la mortalidad, el volumen de líquido en la cavidad pleural y el examen

bacteriológico (animales muertos y líquido pleural).

Resultado: en el grupo I (*Pasteurella multocida*), siete ratones murieron en las primeras 48 horas de experimento. Cinco ratones fueron sacrificados en el período programado, pero ninguno de ellos presentaba empiema. En el grupo II (*Staphylococcus aureus*), solamente un animal murió en las primeras 24 horas, los otros siete (88%) fueron sacrificados y presentaban empiema. En el grupo III, considerados controles, todos los animales sobrevivieron, no se observó ninguna anomalía torácica en el sacrificio. Analizando conjuntamente los grupos, la inducción de empiema estuvo asociada de manera significativa a la inoculación de *Staphylococcus aureus* en el espacio pleural (P<0,001). La cantidad de líquido obtenida en la cavidad pleural de los ratones de este grupo varió de 0,9 ml a 3,9 ml.

Conclusiones: es posible inducir la formación de empiema en ratones utilizando técnica quirúrgica simple, con la inoculación de *Staphylococcus aureus*, en el espacio intrapleural. La *Pasteurella multocida*, a diferencia de lo que ocurre en otros modelos animales, no fue capaz de inducir empiema en ratones.

Palabras clave: ENFERMEDADES PLEURALES
STAPHYLOCOCCUS AUREUS
PASTEURELLA MULTOCIDA

1. Profesor Adjunto de Cirugía Pediátrica. Departamento de Cirugía de la Facultad de Medicina de la Universidad Federal de Rio Grande do Sul (UFRGS). Maestro y Doctor en medicina. Cirujano Pediátrico del Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

2. Profesor Adjunto, Departamento de Pediatría de la Fundación Facultad Federal de Ciencias Médicas de Porto Alegre. Jefe del Servicio de Emergencia Pediátrica del Hospital de Niños de San Antonio de Porto Alegre. Doctor de Neumología, UFRGS.

3. Monitores de la disciplina de Cirugía. Departamento de Cirugía, Facultad de Medicina, UFRGS.

4. Médica veterinaria del Centro de Investigaciones Veterinarias Desidério Finamor.

Publicado en J Pediatr (Rio J) 2001; 77 (6): 469-74.

Summary

Objective: to evaluate empyema formation in rats through the injection of two bacteria (*Pasteurella multocida* and *Staphylococcus aureus*), using a simple, easy to use surgical technique.

Methods: twenty four anesthetized Wistar white rats, 250-300 g in weight, submitted to right anterior thoracotomy, muscular retraction and injection of a 0,2 ml solution into pleural space according the following scheme: group I (n=12): injection of 10^{10} *Pasteurella multocida* cultured in brain heart infusion broth; group II (n=8): injection of 10^{10} *Staphylococcus aureus* cultured in brain heart infusion broth; group III (n=4): injection of bacterium-free brain heart infusion (control). The rats were sacrificed after seven days, and pleural reaction was assessed by macroscopy. Mortality and intrathoracic liquid were evaluated, and bacteriological tests were also performed.

Results: seven rats died within the first 48 hours in group I (*Pasteurella multocida*); five completed the experiment, but none of them presented empyema. Only one animal died within the first 24 hours in group II (*Staphylococcus aureus*); seven (88%) presented empyema at the time of sacrifice. All animals survived in group III (control), without empyema or thoracic abnormalities. Pleural inoculation of *Staphylococcus aureus* (group II) was significantly associated with empyema formation ($P < 0,001$). In this group, the amount of pleural liquid ranged from 0,9 to 3,9 ml.

Conclusion: it is posible to induce empyema in rats through *Staphylococcus aureus* pleural injection by a simple surgical technique. Differently from other experiments, the pleural injection of *Pasteurella multocida* did not provoke empyema in rats.

Key words: PLEURAL DISEASES
STAPHYLOCOCCUS AUREUS
PASTEURELLA MULTOCIDA

Introducción

Empiema, definido como la acumulación de pus en el espacio pleural, es responsable por elevada morbilidad y mortalidad en niños y adultos ⁽¹⁾. El tratamiento del empiema es diferente en cada centro médico, principalmente por la falta de trabajos clínicos adecuadamente realizados en humanos, por la dificultad de encontrar una población homogénea de pacientes y de la inexistencia de un modelo experimental de fácil ejecución, y que posibilite comprobar las diferentes posibilidades terapéuticas disponibles ⁽¹⁾.

Algunos estudios experimentales consiguieron la inducción de empiema en animales. Mavroudis y colaboradores ⁽²⁾ indujeron empiema en suinos a través de la inoculación de varios agentes bacterianos (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Bacteroides fragilis*). Los animales fueron divididos en tres grupos individuales de 30 suinos, desarrollándose empiema en 58% de los animales en el grupo *Staphylococcus aureus*, 37% en el grupo *Escherichia coli*, y no obtuvo éxito en ningún animal del grupo *Bacteroides fragilis*. Su objetivo principal no estaba centrado en el análisis exclusivo del empiema, pero en la evaluación de su comportamiento en la presencia de hemotórax ⁽²⁾.

Sasse y colaboradores ⁽³⁾ indujeron empiema en conejos a través de la inoculación pleural por toracocentesis de *Pasteurella multocida* cultivado en agar. A pesar de que el referido modelo fue el que mejor mimetizó el empiema observado en seres humanos ⁽³⁻⁶⁾, presenta algunas dificultades para ser empleado como modelo animal en nuestro medio. Tonietto y colaboradores ⁽⁷⁾ publicaron un estudio reciente sobre la inducción de empiema en ratones, a través de la inoculación intrapleural de 1 ml/kg de solución conteniendo *Staphylococcus aureus* (10^{10} células/ml) diluida en caldo cerebro-corazón (BHI). La bacteria fue aislada y cultivada a partir de la mucosa oral del ratón e inoculada luego de toracotomía con el animal anestesiado, con intubación traqueal. A pesar de que ese estudio fue realizado en ratones, animales ideales para experimento en nuestro medio debido al bajo costo, facilidades de manejo y de mantenimiento, la técnica empleada fue muy sofisticada, con la necesidad de intubación traqueal y anestesia inhalatoria del animal durante el procedimiento quirúrgico.

El presente estudio tuvo por objetivo evaluar la inducción experimental de empiema en ratones, a través de la inoculación intrapleural de dos bacterias (*Pasteurella multocida* y *Staphylococcus aureus*), utilizando técnica quirúrgica simple y de fácil ejecución.

Métodos

Estudio experimental controlado, realizado en el Centro de Investigaciones Veterinarias Desiderio Finamor (CPVDF), en bioterio aislado y específico para trabajo contaminado. Fueron seleccionados 24 ratones albinos de raza Wistar, adultos, de ambos sexos, pesando entre 250 y 300 gramos, obtenidos aleatoriamente del mismo criador. De acuerdo con la colonia de bacterias a ser utilizada para inoculación, los animales fueron divididos en tres grupos principales:

- Grupo I (n=12): inoculación en el espacio pleural de 0,2 ml de solución de *Pasteurella multocida*, 10^{10} unidades formadoras de colonias (UFC)/ml, diluida en caldo de cerebro-corazón (BHI). Desconociendo el comportamiento del animal frente a la exposición bacteriana, especialmente la pérdida temprana por infección, los animales fueron subdivididos en dos subgrupos, de acuerdo con la utilización de antibiótico terapia, iniciada a partir de la recuperación posoperatoria.
- Subgrupo Ia (n=8): solución de amoxicilina en concentraciones de 0,05 o 0,1 %, diluida en la ración híbrida diaria, administrada por vía oral ad libitum.
- Subgrupo Ib (n=4): ausencia de antibiótico en la ración híbrida diaria, ad libitum.
- Grupo II (n=8): inoculación en el espacio pleural de 0,2 ml de solución de *Staphylococcus aureus*, 10^{10} UFC/ml diluida en BHI.
- Grupo III (n=4): inoculación en el espacio pleural de 0,2 ml de caldo de cerebro-corazón BHI estéril.

La bacteria *Pasteurella multocida* fue obtenida en el laboratorio del CPVDF. La bacteria *Staphylococcus aureus* fue aislada de la mucosa oral de los animales, recogida a través de *swab* y cultivada en el laboratorio CPVDF.

La logística del experimento estuvo fundamentada en dos etapas de evaluación. En un primer momento, los autores probaron el modelo experimental de inducción del empiema en los ratones haciendo uso apenas de la inoculación de *Pasteurella multocida* (n=12) y de los respectivos controles (n=2). En una segunda etapa, continuó el experimento con la inoculación del *Staphylococcus aureus* (n=8) y sus respectivos controles (n=2).

El proyecto fue evaluado y aprobado por el Grupo de Investigación y Posgrado del Hospital de Clínicas de Porto Alegre y por el Centro de Investigación Veterinaria Desiderio Finamor (CPVDF). Durante todo el estudio, los animales fueron tratados de acuerdo con protocolos específicos para manejo y cuidado de animales de laboratorio.

Inducción del empiema

La inducción anestésica de los animales fue realizada por vía inhalatoria, a través de algodón embebido en éter etílico, en cámara de vidrio cerrada. El mantenimiento anestésico fue hecho con pentobarbital sódico (25 mg/kg) administrado por vía intraperitoneal. Los ratones eran posicionados en decúbito dorsal, realizada tricotomía en la región torácico anterior, antisepsia con iodofom alcohólico y colocación de campos esterilizados. Realizada toracotomía anterior oblicua en el hemotórax derecho, con separación de la musculatura y exposición de los espacios intercostales. Realizada abertura del cuarto espacio intercostal con pinza hemostática e inoculación de la solución. Concluida esta etapa del experimento, la musculatura previamente separada era liberada, con posterior cierre de la piel con hilo mononylon 4-0. Todo el procedimiento fue realizado de manera aséptica.

Verificación del empiema

Todos los animales eran sacrificados con la administración de dosis letal de pentobarbital sódico por vía intraperitoneal. Los animales que morían antes del término del experimento eran necrosados, evaluándose la presencia de empiema y recogiendo muestras del tejido de hígado y bazo para cultura.

La caracterización de empiema se daba por la presencia de líquido pleural de aspecto turbio e identificación de microorganismos a la evaluación bacteriológica del material.

Análisis macroscópico de las alteraciones pleurales

Los animales fueron sacrificados tres, cinco o siete días luego de la inoculación pleural.

Los animales del grupo I fueron sacrificados en siete días.

Mitad de los animales del grupo II fue sacrificada en tres días y la otra mitad, en cinco días. En el grupo control (grupo III), mitad de los animales fue sacrificada en cinco días y la otra mitad en siete días.

Luego del sacrificio, las anormalidades pleurales fueron analizadas microscópicamente de acuerdo a la escala de intensidad de la reacción pleural (tabla 1).

Análisis estadístico

Las variables de caracterización de la muestra son descritas en valores absolutos y percentil es, con respectivas medias y desvíos-padrón. Las diferencias en el volumen medio de líquido obtenido son comparadas a través del test t para muestras no pareadas. La asociación entre las bacterias inoculadas y la inducción de empie-

Tabla 1. Graduación de la reacción pleural

Grado	Resultado macroscópico
0	Ausencia de adherencia o líquido pleural
1	Líquido turbio, con adherencia en el lugar de la incisión quirúrgica
2	Líquido purulento, con fibrina, con moderada adherencia pleural
3	Adherencias densas y bien desarrolladas, con o sin líquido pleural
4	Empiema franco, encapsulado, con fibrosis.

ma es verificada por el test de Chi-cuadrado. Un valor de “p” de 0,05 fue considerado como de significancia.

Resultados

La distribución de los animales en los tres grupos, de acuerdo a su supervivencia luego de la inoculación bacteriana intrapleural y el término del experimento (por sacrificio de los animales), puede verse en la figura 1.

En el grupo I (n=12), siete ratones murieron en las primeras 48 horas de experimento. Cinco ratones fueron sacrificados en el período estipulado de una semana, pero en ninguno fue evidenciado resultados compatibles con empiema. Uno de ellos exhibía fibrosis de pared torácica, mientras que los otros cuatro no presentaban ninguna anomalía a la evaluación macroscópica de la pared torácica. Analizando individualmente los subgrupos del experimento, se observa que el uso de antibiótico en el subgrupo la no disminuyó la mortalidad de los animales ni tampoco contribuyó para la inducción de empiema (figura 2)

En el grupo II (n=8), solamente un animal murió en las primeras 24 horas luego de la inoculación del agente bacteriano (*Staphylococcus aureus*). Todos los otros (n=7, 88%) completaron el experimento y presentaban evidencia de empiema a la microscopía. El período en el que fue realizado el sacrificio no evidenció diferencia en cuanto a los resultados, aunque la cantidad media de líquido recogida haya tendido a ser mayor en los animales analizados tres días luego de la inoculación bacteriana ($3,5 \pm 0,1 \text{ ml} \times 2,0 \pm 2,8 \text{ ml}$ con medianas de 3,5 y 1,1 respectivamente) tal diferencia no fue significativa ($p=0,09$), y la cantidad total de líquido obtenido varió de 0,9 a 3,9 ml. El cultivo de ese líquido presentó crecimiento de *Staphylococcus aureus*.

En el grupo III (n=8), considerados controles, todos los animales sobrevivieron, no se observó líquido pleural o anomalía torácica en el sacrificio.

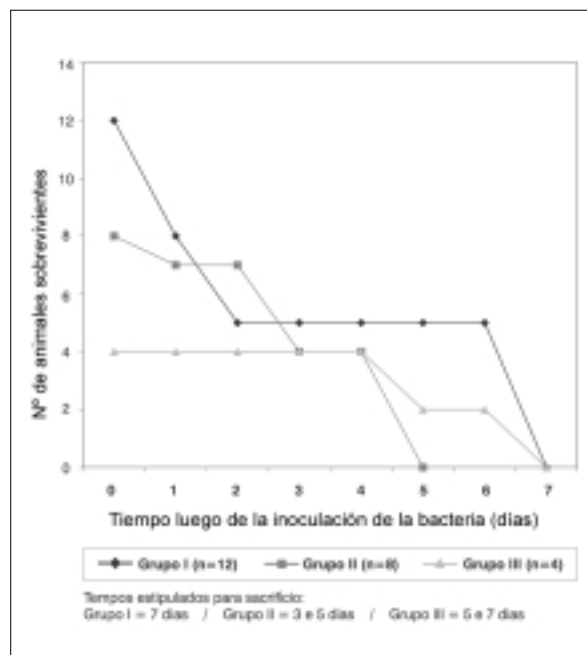


Figura 1. Supervivencia y sacrificio de los ratones luego de la inoculación (tiempo 0) de bacteria intrapleural.

El cultivo de tejido (bazo e hígado) de los animales muertos antes del sacrificio mostró la misma bacteria previamente inoculada en el espacio intrapleural. En la tabla 2, podemos observar la distribución de los resultados macroscópicos de la reacción pleural de acuerdo a puntajes de intensidad.

Analizando estadísticamente los resultados obtenidos entre los grupos, podemos observar asociación estadísticamente significativa de ocurrencia de empiema en animales inoculados con *Staphylococcus aureus* ($p<0,001$)

Discusión

El tratamiento apropiado del empiema es controvertido y ha sido basado en la experiencia personal y en el limitado número de casos relatados en la literatura. Las decisiones quirúrgicas son influenciadas por una serie de variables, tales como edad del paciente, estado clínico, respuesta al antibiótico terapia, evolución y duración del empiema. Los tratamientos posibles incluyen solamente antibióticos, o antibióticos asociados a toracocentesis, drenaje torácico cerrado, fibrinolítico toracoscopia, minitoracotomía, drenaje torácico abierto y tórax otomía usual y decorticación^(1,8,9). La creación de modelos experimentales de empiema es fundamental para estudiar prospectivamente estas varias opciones terapéuticas disponibles, pudiéndose realizar estudios en fases específicas del empiema, además de poder contro-

Tabla 2. Resultados macroscópicos en el momento del óbito o en el sacrificio de los animales (de acuerdo con graduación de la tabla 1)

	Graduación resultados macroscópicos				
	0	1	2	3	4
Grupo I (n=12)	12	-	-	-	-
Grupo II (n=8)	1	7	-	-	-
Grupo III (n=4)	-	-	-	-	-

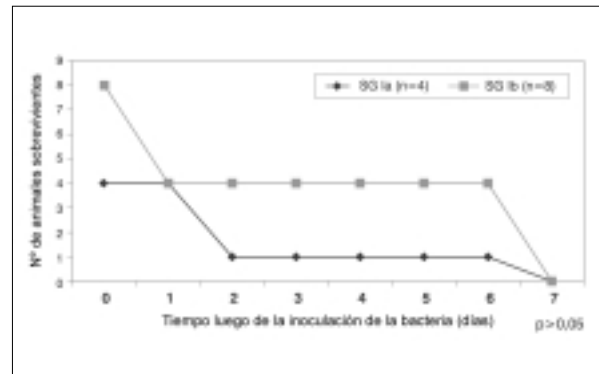
p < 0,001

lar variables clínicas de confusión y establecer un número adecuado de animales, objetivando identificar mayor poder estadístico a los análisis.

Light ha sido el investigador que más ha estudiado empiema experimentalmente^(1,3,8). Ha desarrollado un modelo de empiema en conejos a través de instalación intrapleural de *Pasteurella multocida*. La inoculación intrapleural es realizada a través de punción torácica^(3,6,8). Debido a extrema vulnerabilidad de estos animales, con muerte temprana por sepsis, ese autor administra antibiótico parenteral (penicilina) diariamente. El gran inconveniente para la utilización de ese modelo en nuestro medio es operacional. El costo del animal es elevado, además de necesitar cuidados específicos para su mantenimiento que, frecuentemente, requieren la utilización de un laboratorio más sofisticado para mantener a los animales libres de enfermedades. Ese modelo ha sido reproducido en otros centros, con suceso, con la realización de investigaciones específicas sobre el manejo del empiema. Aunque utilice un procedimiento mínimamente invasivo, de fácil ejecución técnica (punción e inoculación de la bacteria) es realizado a través de la monitorización de la presión intrapleural (transductor conectado a osciloscopio) con el fin de facilitar la confirmación del espacio pleural^(3,6).

Al pensar en este estudio, creíamos que el ideal para nuestra realidad sería el desarrollo de modelos experimentales en ratones, pues estos animales son más baratos, resistentes y de fácil mantenimiento en nuestro medio.

Recientemente, Tonietto y colaboradores⁽⁷⁾ relataron estudio de empiema en ratones, a través de instalación intrapleural de *Staphylococcus aureus*. La bacteria fue aislada de la saliva del animal y cultivada en laboratorio. El animal fue sometido a anestesia general, intubación traqueal y toracotomía para exposición de la región pleural. A pesar de haber sido utilizado un animal considerado más apropiado a nuestra realidad, la técnica de anestesia y cirugía realizadas, con necesidad de intuba-

**Figura 2.** Sobrevida y sacrificio de los ratones luego de la inoculación (tiempo 0) de *Pasteurella multocida* (grupo I), considerando uso o no de antibiótico terapia.

ción traqueal y ventilación mecánica, tornan el modelo aún sofisticado y, consecuentemente, de difícil reproducción.

El experimento por nosotros idealizado es de técnica más simple. Hace uso de ratones como modelo animal pero utiliza técnica anestésica sin necesidad de intubación traqueal o uso de soporte ventilatorio mecánico. El abordaje quirúrgico a través de toracotomía fue semejante al estudio relatado previamente⁽⁷⁾ aunque sin necesidad de someter al animal a la técnica de traqueotomía para obtención de la vía aérea ni necesitar de ventilación artificial mecánica. En nuestro experimento, el procedimiento técnico realizado fue simple y seguro.

El pequeño neumotórax residual que eventualmente ocurrió luego de la toracotomía no provocó mortalidad, ya que todos los animales utilizados como controles sobrevivieron al procedimiento quirúrgico (grupo III). Esto es importante relatar pues, luego del término del procedimiento quirúrgico, los investigadores no tuvieron ninguna preocupación de aproximación de la musculatura torácica o retiro del aire residual antes del cierre de la piel a diferencia de los modelos experimentales anteriores⁽⁶⁾.

Iniciamos nuestro estudio con la *Pasteurella multocida*, por ser inofensiva al hombre^(3,8) y ser la bacteria más utilizada en la inducción de empiema en otros modelos animales. No teníamos ninguna información acerca de la ineffectividad de la bacteria en el ratón. La mortalidad expresiva antes de 48 horas, con cultura de hígado y bazo de esos animales mostrando la presencia de la bacteria, supone que los animales murieron debido a sepsis causada por las bacterias inoculadas. La mortalidad observada fue expresiva luego de la inoculación de esta bacteria, independiente de la administración de antibiótico. La preocupación con la composición de un subgrupo que hiciese uso diario de antibiótico por vía oral también nos trajo algunas dificultades. A pesar de saber de la

absorción errática de la droga administrada por esa vía, la prescripción diaria de antibiótico parenteral, como propuesto por Sasse y colaboradores⁽³⁾, necesitaría anestesia diaria del animal, tornando el experimento complejo y fuera de los objetivos de crear un modelo de fácil ejecución.

Por lo tanto, optamos por la utilización del antibiótico por vía oral. Aun utilizando dosis elevadas de antibiótico, no logramos obtener empiema luego de la inoculación pleural de la *Pasteurella multocida*, ya que los animales continuaron muriendo por septicemia. Tal vez la ruta utilizada para administración de la droga no haya sido la ideal, desde el punto de vista absorptivo, y que los animales hayan muerto por no haber alcanzado niveles terapéuticos del fármaco, pero el hecho es que aun los animales que sobrevivieron no desarrollaron empiema.

En la segunda etapa de nuestro experimento, con la inoculación de *Staphylococcus aureus* se observó presencia de líquido pleural turbio en los animales sacrificados luego de 3 y 5 días de la inoculación. La cultura de ese líquido confirmó la presencia de *Staphylococcus aureus*, caracterizando la presencia de empiema.

Tratándose de un estudio experimental, algunas condiciones metodológicas merecen ser discutidas. Una potencial limitación del estudio puede estar direccionada hacia la posibilidad de comparación de los resultados entre los dos primeros grupos, al considerar que el análisis de los resultados macroscópicos fue realizado en diferentes momentos de sacrificio de los animales.

Aun sabiendo de esa potencial limitación, es importante resaltar que no fuimos capaces de demostrar resultados compatibles con empiema en ninguno de los animales analizados en el grupo I.

Este resultado nos es suficiente para considerar que la inoculación de *Pasteurella multocida* en el espacio pleural de los ratones no es adecuada para la viabilización de un modelo experimental de empiema, por lo menos dentro de las técnicas por nosotros utilizadas. Nuestro principal objetivo era viabilizar un nuevo modelo experimental para enfermedad respiratoria tan prevalente, lo cual logramos obtener con utilización de las colonias de *Staphylococcus aureus*, utilizando una técnica más simple que las usadas anteriormente⁽⁷⁾.

La opción de sacrificar los animales en tiempos menores en el grupo II, estaba basada en la posibilidad de identificar manifestaciones pleurales más sutiles, que de alguna manera pudiesen ocurrir más precozmente en este modelo animal, considerando los resultados obtenidos en la primera fase del experimento. Creemos que eso no ocurrió ya que los resultados macroscópicos evidenciados, la apariencia y el volumen del líquido obtenido

sugieren una respuesta inflamatoria pleural significativa, tanto a los tres como a los cinco días.

La técnica quirúrgica de la toracotomía y el medio de dilución de las bacterias antes de su inoculación en la región pleural no ocasionaron ninguna complicación.

Eso puede ser comprobado en los animales utilizados como control (grupo III) que sobrevivieron hasta el fin del experimento y no presentaron ninguna anomalía macroscópica en el momento de la necropsia. De alguna manera, eso también disminuye la influencia que podríamos haber tenido en los resultados, por la no randomización del experimento, esto es, una mayor mortalidad de los animales y/o insuceso en el grupo primeramente experimentado.

Este estudio mostró que es posible la realización de toracotomía e inoculación pleural de bacterias en ratones anestesiados, utilizando técnica quirúrgica simple, sin necesidad de intubación traqueal y/o ventilación mecánica.

Para aplicabilidad del modelo, la no utilización de soporte ventilatorio mecánico garantiza ser su viabilidad operacional. De la misma manera, la no realización del procedimiento quirúrgico complementario para obtención de un acceso a la vía aérea por traqueotomía, disminuye la complejidad de la intervención del investigador y del tiempo usado con el procedimiento con un resultante potencial aumento de morbilidad. En este modelo animal, la inoculación intrapleural de *Pasteurella multocida*, en concentraciones de 10^{10} UFC/ml, mostró extrema virulencia llevando a la muerte temprana a la mayoría de los animales. Aun en los que sobrevivieron no fue posible observar la inducción de empiema, lo que hace del experimento un modelo inadecuado para el objetivo establecido. Mientras tanto, en el mismo modelo animal, la inoculación intrapleural de *Staphylococcus aureus*, en concentraciones de 10^{10} UFC/ml, provoca la formación de empiema, tanto en tres como en cinco días luego del procedimiento quirúrgico. Tales resultados abren nuevas perspectivas para el desarrollo de estudios experimentales direccionados a una mejor evaluación y manejo del empiema.

Bibliografía

1. **Light RW.** Pleural Diseases. 3ª ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1995.
2. **Mavroudis C, Ganzel BL, Katzmark S, Polk HC.** Effect of hemothorax on experimental empyema thoracic in the guinea pig. J Thorac Cardiovasc Surg 1895; 89: 42-9.
3. **Sasse SA, Causing LA, Mulligan ME, Light RW.** Serial pleural fluid analysis in a New Experimental Model of Empyema. Chest 1996; 109: 1043-8.
4. **Mackinlay TAA, Lyons GA, Chimondeguy DJ, Piedras MAB, Angaramo G, Emery J.** VATS debridement versus

- thoracotomy in the treatment of loculated postpneumonia empyema. *An Thorac Surg* 1996; 61: 1626-30.
5. **Temes RT, Follis F, Kessler RM, Pett SB, Wernly JA.** Intrapleural fibrinolytics in the management of empyema thoracis. *Chest* 1996; 110: 102-6.
 6. **Teixeira LR, Sasse AS, Villarino MA, Nguyen T, Mulligan ME, Light RW.** Antibiotic levels in empyema pleural fluid. *Chest* 2000; 117: 1734-9.
 7. **Tonietto T, Pilla ES, Madke GR, Silva UL, Felicetti JC, Camargo JJP, et al.** Empiema pleural experimental em ratos: avaliação dos efeitos do uso intrapleural de Dextran-40 na fase fibrinopurulenta. *J Pneumol* 1999; 25:147-52.
 8. **Sasse S, Nguyen TK, Mulligan M, Wang NS, Mahutte CK, Light RW.** The effects of early chest tube placement on empyema resolution. *Chest* 1997; 111:1679-83.
 9. **Fraga JC, Nunes G, Hinke T, Schopf L, Antunes CR.** Toracoscopia em crianças com derrame parapneumônico complicado. *Revista HCPA* 2000; 20:13-20.

Correspondencia: Dr. José Carlos Fraga
Rua Ramiro Barcelos, 2350 – sala 600
CEP 90430-000 – Porto Alegre, RS
E-mail: jcfraga@conex.com.br