

SILVIO HENRIQUE DE FREITAS

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS, MORFOMÉTRICOS E ULTRA-
ESTRUTURAS DO BAÇO DE RATOS APÓS O CLAMPEAMENTO
TOTAL DO PEDÍCULO HEPÁTICO**

Recife – PE

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

SILVIO HENRIQUE DE FREITAS

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS, MORFOMÉTRICOS E ULTRA-
ESTRUTURAIIS DO BAÇO DE RATOS APÓS O CLAMPEAMENTO
TOTAL DO PEDÍCULO HEPÁTICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco como requisito parcial para obtenção de grau de Doutor em Ciência Veterinária.

Orientador

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

Recife – PE

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS, MORFOMÉTRICOS E ULTRA-
ESTRUTURAIS DO BAÇO DE RATOS APÓS O CLAMPEAMENTO
TOTAL DO PEDÍCULO HEPÁTICO**

Tese de doutorado elaborada por

SILVIO HENRIQUE DE FREITAS

Aprovada em...../...../.....

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

Orientador – Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal – UFRPE

Prof. Dr. Manuel de Jesus Simões

Departamento de Morfologia da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

Prof. Dr. Alessandro César Jacinto da Silva

Departamento de Morfologia e Fisiologia animal – UFRPE

Prof. Dr. Lázaro Manoel de Camargo

Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de
Cuiabá – UNIC

Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio

Departamento de Histologia e Embriologia da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

DEDICATÓRIA

À minha família, orientador e aos amigos que direta ou indiretamente participaram desse trabalho e, em determinada situação, mostraram caminhos que até então não eram vistos por mim.

AGRADECIMENTO

Ao Orientador Dr. Joaquim Evêncio Neto, Professor Adjunto da Disciplina de Histologia do Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco-URFPE, pelo empenho, atenção e confiança depositada em mim e em toda equipe empenhada nesse trabalho. Obrigado pelo apoio e, principalmente, pelo tempo cedido em prol da nossa luta voltada para a conclusão desse trabalho;

Ao Dr. Manuel de Jesus Simões, Professor Adjunto do Departamento de Morfologia da Disciplina de Histologia da Universidade Federal de São Paulo UNIFESP-EPM e Faculdade de Medicina de Cuiabá-UNIC, pela humildade, atenção e dedicação voltada para pesquisa. Obrigado pela colaboração e dedicação, não só durante o doutorado, mas por todo tempo que estivemos juntos trabalhando.

Ao Dr. Lázaro Manoel de Camargo, Professor e Diretor da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Cuiabá - UNIC, pela amizade, dedicação e confiança depositada em meu trabalho e, principalmente, pelo apoio oferecido em todo meu trabalho. Obrigado pela credibilidade;

À Professora Renata Gebara Sampaio Dória, pela paciência, dedicação e companherismo durante o desenvolvimento desta tese;

Ao Dr. Carlo Ralph De Muis, Professor, Coordenador de Departamento de Legislação e Dados Institucionais/Avaliação – DLDI e Coordenador de Pesquisa – CPQ, pela dedicação direcionada à pesquisa e contribuição dada à minha tese. Obrigado pelo apoio nesse trabalho.

À secretária Edna Shérias do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE, pelo apoio e dedicação voltada aos alunos, funcionários e, principalmente, aos professores dessa instituição.

ASPECTOS MORFOLÓGICOS, MORFOMÉTRICOS E ULTRA- ESTRUTURAIS DO BAÇO DE RATOS APÓS O CLAMPEAMENTO TOTAL DO PEDÍCULO HEPÁTICO

RESUMO - Uma das complicações do clampeamento total do pedículo hepático é a congestão esplâncnica e, conseqüentemente, a congestão esplênica. Este trabalho teve como objetivo avaliar as alterações morfológicas, morfométricas e ultra-estruturais que ocorreram no baço frente à isquemia produzida pelo clampeamento total do pedículo hepático. Para tanto foram utilizados 40 ratos machos, divididos em quatro grupos de 10 animais. O grupo controle (C) não foi submetido à isquemia, já os grupos experimentais (E₁, E₂ e E₃) foram submetidos ao clampeamento por 10, 20 e 30 minutos, respectivamente. Após esses períodos, fragmentos do baço foram retirados e analisados histologicamente pela técnica de Hematoxilina-Eosina, Ferrocianeto-Férrico e microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados mostraram alterações microscópicas nos grupos E₁, E₂ e E₃ que permitem concluir que 10 minutos de clampeamento do pedículo hepático são suficiente para apresentar sinais de congestão esplênica e 20 e 30 minutos promovem intensa digestão de hemácias pelos macrófagos, com presença de grânulos de ferro (hemossiderina) no parênquima esplênico.

Palavras chave: Congestão, Hemossiderina, Baço, Rato, Ultra-estrutura.

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS, MORFOMÉTRICOS E ULTRA- ESTRUTURAIS
DO BAÇO DE RATOS APÓS O CLAMPEAMENTO TOTAL DO PEDÍCULO
HEPÁTICO**

**MORPHOLOGIC, MORPHOMETRIC AND ULTRASTRUCTURAL ASPECTS OF
THE SPLEEN OF RATS AFTER TOTAL CLAMPING OF THE HEPATIC PEDICLE**

ABSTRACT - One of the complications of hepatic pedicle total clamping is the splanchnic congestion and consequently a splenic congestion. The aim of this study was to evaluate the macro and microscopic alterations that occurred in the spleen during an ischemia produced by the hepatic pedicle total clamping. Fourty male rats were divided in four groups of ten animals each. The control group (C) was not submitted to ischemia and the experimental groups (E₁, E₂ and E₃) were submitted to the clamping during 10, 20 and 30 minutes, respectively. After these periods, spleen fragments were collected and histological analyzed by the eosin-hematoxilin and ferric ferrocyanide staining technique. Based on the results it is possible to conclude that 10 minutes of hepatic pedicle total clamping is sufficient to show signs of splenic congestion and 20 and 30 minutes promote intense red bood cels digestion by the macrophages with the presence of iron granules (hemosiderin) at the splenic parenchyma.

Keyword: Congestion, Hemossiderin, Spleen, Rat, Ultrastructure.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
3 OBJETIVOS	17
4 MATERIAL E MÉTODO	18
4.1. Amostras	18
4.2. Procedimento	19
4.3. Estudo morfológico ao microscópio de luz	25
4.4. Estudo morfométrico	26
4.5. Estudo ultra-estrutural	27
4.6. Análise estatística	28
5 RESULTADOS	29
5.1. Macroscopia	29
5.2. Microscopia de luz	29
5.3. Estudo Morfométrico	32
5.4. Microscopia eletrônica de transmissão	34
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÃO	40
8 REFERÊNCIAS	41
ANEXOS	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Aplicação da associação anestésica pela via intramuscular na região posterior da coxa direita.....	19
Figura 2.	Animal sendo submetido à tosquia da região abdominal com máquina tosquiadeira.....	20
Figura 3.	Anti-sepsia da região abdominal do animal com iodo povidona.....	20
Figura 4.	Panos de campo colocados sobre o animal e fixos com pinças Backhaus.....	21
Figura 5.	Incisão mediana pré-retro umbilical com bisturi.....	21
Figura 6.	Ampliação da incisão da cavidade abdominal com tesoura Metzenbaum.....	22
Figura 7.	Apresentação do hilo hepático (sistema porta hepático).....	22
Figura 8.	Clampeamento do pedículo hepático com pinça vascular.....	23
Figura 9.	Coleta do baço após o clampeamento utilizando tesoura Metzenbaum.....	24
Figura 10.	Fotomicrografias mostrando cortes histológicos de baços de ratos pertencentes aos vários grupos de estudo. Notar em C (Grupo Controle) polpa vermelha com poucos grânulos de hemossiderina, no entanto, estão aumentados (setas) nos grupos E1 (10 minutos) E2 (20 minutos) e E3 (30 minutos). H.E 10X.....	30
Figura 11.	Fotomicrografias mostrando cortes histológicos de baços de ratos pertencentes aos vários grupos de estudo. Notar em C (Grupo Controle) pouca reatividade, que se acha aumentada, de forma acentuada e progressiva (setas), nos grupos E1 (10 minutos) E2 (20 minutos) e E3 (30 minutos). Reação de Perls (Ferrocianeto-férrico) 10X.....	31
Figura 12.	Eletromicrografias mostrando macrófagos presentes nos cordões de Billroth de ratos pertencentes aos vários grupos de estudo. Notar em C (Grupo Controle) poucos grânulos eletrondensos (seta), que aumentam em números (setas) com o decorrer do tempo de clampeamento hepático (E ₁ , E ₂ e E ₃). 8200X.....	34

LISTA DE TABELA

- Tabela 1.** Porcentagem (%) da área ocupada pelos grânulos de hemossiderina na polpa vermelha dos baços pertencentes aos vários grupos de estudo (C, E₁, E₂ e E₃) após o clampeamento total do pedículo hepático..... **32**
- Tabela 2.** Porcentagem (%) de pigmento de hemossiderina (média ± desvio padrão) obtida na polpa vermelha dos ratos pertencentes aos vários grupos de estudo (C, E₁, E₂ e E₃) após o clampeamento total do pedículo hepático..... **33**

LISTA DE GRÁFICO

- Gráfico 1.** Porcentagem de pigmento de hemossiderina (média \pm desvio padrão) obtida na polpa vermelha dos baços de ratos pertencentes aos vários grupos de estudo (C, E₁, E₂ e E₃) após o clampeamento do pedículo hepático..... **33**

1. INTRODUÇÃO

As hemorragias hepáticas que ocorrem com frequência após traumas, principalmente nas ressecções e transplantes hepáticos, devem ser controladas; para tanto, modelos experimentais de isquemia hepática têm sido muito difundidos. Inicialmente, Pringle (1908) utilizou o clampeamento total do hilo hepático para conter os casos de hemorragias hepáticas. Entretanto, Sébe (1999) trabalhando com clampeamento total do pedículo hepático em ratos, observou que a privação de sangue neste órgão, por mais de vinte minutos, leva a lesões nas organelas dos hepatócitos e, também, à congestão esplâncnica.

O baço é um órgão constituído por uma cápsula fibroelástica, de onde partem trabéculas que servem para conduzir vasos e nervos e por um estroma representado por uma rede de fibras e células reticulares que sustentam o parênquima ou polpa esplênica (polpas branca e vermelha) (EICHNER, 1979; BLUE e WEISS, 1981; DELLMANN e BROWN, 1982; STITES et al., 1997). A polpa branca é formada por um conjunto de nódulos linfáticos apresentando um centro germinativo e inúmeras células linfóides que se localizam ao longo das arteríolas esplênicas. Já a polpa vermelha representa a maior parte do baço, onde são observados inúmeros sinusóides sangüíneos que se entrelaçam e se anastomosam em várias direções, separados por cordões celulares esplênicos, representados por fibroblastos, leucócitos, eritrócitos e macrófagos (DOASSAN et al., 1984; ATRES, 1991; BANKS, 1992; ROITT, 1992; POPE e ROCHAT, 1996). A reserva de hemácias no baço pode, quando solicitado e sobre ação das catecolaminas, elevar o hematócrito em até 10% do seu valor normal (LIPOWITZ e BLUE, 1998). O baço possui função hematopoiética nos recém nascidos, podendo, também, desempenhar essa função nos adultos (LIPOWITZ e BLUE, 1998). A estrutura do baço, semelhante a uma peneira, torna-o eficiente no monitoramento de células sangüíneas viáveis, facilitando, com isso, a fagocitose destas pelos macrófagos. Estes acumulam pigmentos de hemossiderina, uma massa rica em ferro, oriunda da degradação da hemoglobina (SWENSON e REECE, 1996; COUTO e HAMMER, 1997; CARLTON e McGAVIN, 1998). Este órgão está, também, envolvido com os mecanismos de defesa do organismo, através da produção de linfócitos e anticorpos (LIPOWITZ e BLUE, 1998; RICHARD e SHERIND, 1998; SLATTER, 1998; MARQUES et al., 2004).

A importância desta pesquisa está em aproximar os modelos experimentais da situação real em que tal procedimento é utilizado na prática médica diária. No presente estudo procurou-se utilizar o modelo de isquemia hepática total, através do clampeamento total do

pedículo hepático sem derivação vascular, para pesquisar, em diferentes tempos, as alterações histológicas que ocorrem no baço em diferentes tempos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

O baço é um órgão linfóide que exerce funções complexas e variadas. Apesar de ter sido bastante estudado, muitas destas funções ainda permanecem inexploradas ou inexplicadas (POPE e ROCHAT, 1996).

Anatomicamente, o baço está localizado na cavidade abdominal, no quadrante cranial esquerdo, em uma orientação dorsoventral, entre a curvatura maior do estômago, peritônio parietal da parede abdominal lateral esquerda e o fígado. Ele está fixado ao omento maior na região do hilo, na superfície visceral. Através do hilo, várias artérias e nervos simpáticos penetram o baço e vasos venosos e linfáticos deixam o mesmo (EVANS e LAHUNTA, 1994; LIPOWITZ e BLUE, 1998; GARTNER e HIATT, 1999). Ao corte, ele apresenta uma superfície de coloração vermelho-escuro, conhecida como polpa vermelha, com áreas acinzentadas, que constituem a polpa branca e estrias denominadas trabéculas (POPE e ROCHAT, 1996; LIPOWITZ e BLUE, 1998).

Microscopicamente, o baço é constituído por uma espessa cápsula fibroelástica, composta por tecido conjuntivo denso, fibras elásticas e musculares lisas, de onde partem trabéculas que se ramificam e anastomosam repetidas vezes formando uma complexa trama que sustenta o parênquima esplênico (polpas branca e vermelha) e serve para conduzir os vasos e nervos (EICHNER, 1979; BLUE e WEISS, 1981; DELLMANN e BROWN, 1982; GEORGE et al., 1998; BIER et al., 1989; STITES et al., 1997; ZHANG, 2001).

Histologicamente, o baço apresenta uma rede tridimensional de fibras e células reticulares que se interligam entre a cápsula e as trabéculas, formando o parênquima esplênico (EICHNER, 1979; BLUE e WEISS, 1981; DELLMANN e BROWN, 1982; BIER et al., 1989; STITES et al., 1997, GARTNER e HIATT, 1999).

A polpa branca é constituída por uma massa linfóide esplênica composta por linfócitos T e B, que corresponde aproximadamente a 5 a 20% da massa total do baço. Estas células compreendem a bainha linfática periarterial que está intimamente associada com a arteríola central (BURKITT et al., 1994; GARTNER e HIATT, 1999). Os linfócitos T estão localizados ao redor da arteríola central, enquanto os linfócitos B constituem os nódulos linfáticos ovóides, que podem apresentar centros germinativos com atividade antigênica (GEORGE et al., 1998; GARTNER e HIATT, 1999). Esta polpa está envolvida por uma zona marginal constituída por plasmócitos, linfócitos T e B, macrófagos e células dendríticas

apresentadoras de antígenos (GARTNER e HIATT, 1999). Entre as polpas branca e vermelha há uma região denominada de zona marginal que recebe sangue de várias artérias terminais e é densamente habitada por macrófagos (LIPOWITZ e BLUE, 1998).

A polpa vermelha, maior porção do baço, é constituída de sinusóides sangüíneos e cordões esplênicos (cordões de Billroth) que se entrelaçam e se anastomosam em várias direções. Nela ainda estão presentes várias células como fibroblastos, leucócitos, eritrócitos e macrófagos (DOASSANS et al., 1984; TIZARD, 1985; ATRES, 1991; BANKS, 1992; ROITT, 1992; POPE e ROCHAT, 1996; GARTNER e HIATT, 1999). É bastante semelhante a uma esponja, onde as lacunas representam os sinusóides e as estruturas que as interligam representam os cordões esplênicos, também denominados de parênquima (GARTNER e HIATT, 1999). Os sinusóides esplênicos possuem um endotélio revestido por células fusiformes e uma lâmina basal descontínua, sobre as quais estão presentes fibras reticulares distribuídas transversalmente (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). Entre as células endoteliais há espaços por onde migram hemácias dos cordões esplênicos para os sinusóides. As hemácias velhas ou parasitadas, por perderem a sua flexibilidade e por não conseguirem penetrar nos sinusóides, são fagocitadas e destruídas pelos macrófagos (hemocaterese).

Esses macrófagos, que são células muito ativas, possuem à microscopia eletrônica uma superfície irregular, com inúmeras saliências e reentrâncias e um citoplasma contendo vários lisossomos que depositam suas enzimas nos vacúolos que contêm material fagocitado, formando os fagossomos, onde vai ser realizada a digestão do material fagocitado (GEORGE et al., 1998; GARTNER e HIATT, 1999; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). A hemoglobina resultante da digestão de hemácias se desdobra em porções heme e globina. A fração globina é quebrada em seus constituintes de aminoácidos que vão para circulação sanguínea e as moléculas de ferro, da fração heme, no interior dos macrófagos, se agrupam formando um pigmento denominado de hemossiderina que são levados à medula óssea pela transferrina, onde são utilizadas para formação de novas hemácias (SWENSON e REECE, 1996; COUTO e HAMMER, 1997; CARLTON e MCGAVIN, 1998; GEORGE et al., 1998; GARTNER e HIATT, 1999, ALENCAR et al., 2002).

A irrigação esplênica é realizada pela artéria esplênica que vai se ramificando à medida que penetra a cápsula através do hilo do baço. Vasos menores, como as artérias trabeculares, vão surgindo e sendo transportados para o interior do parênquima esplênico por trabéculas cada vez menores (KOLB, et al., 1984; GARTNER e HIATT, 1999). Estes vasos esplênicos, ao atingirem diâmetros de 0,2mm, abandonam as trabéculas e vão sendo envolvidos por uma bainha de linfócitos denominada bainha linfática periarterial, rica em

linfócitos T. Por estar localizado no centro da bainha, o vaso sanguíneo passa a ser chamado de artéria central (KOLB et al., 1987; BURKITT, 1994; GARTNER e HIATT, 1999).

A artéria central, na sua extremidade, perde a bainha e se subdivide em vários ramos curtos e paralelos, denominados de arteríolas penicilares, que penetram a polpa vermelha. Estas arteríolas possuem três regiões denominadas de arteríola pulpar, arteríola encapsulada e capilares arteriais terminais (GUYTON, 1992; BURKITT et al., 1994; GARTNER e HIATT, 1999). É sabido que estes últimos vasos despejam sangue nos seios esplênicos, porém, o mecanismo da circulação ainda não está completamente elucidado, provocando a formulação de três teorias: circulação fechada, circulação aberta e mista. Na primeira, o endotélio dos capilares arteriais terminais tem continuidade com o endotélio dos sinusóides. Na segunda, acreditam que o endotélio dos capilares arteriais terminais não está interligado com o endotélio dos sinusóides, onde o sangue percorre a polpa vermelha até os seios esplênicos. Na última, o endotélio dos capilares terminais pode ou não estar ligado ao endotélio dos sinusóides, caracterizando uma circulação mista. O sangue dos sinusóides esplênicos é drenado por pequenas veias da polpa vermelha que vão aumentando de calibre até formar a veia esplênica que é uma tributária da veia porta hepática (GARTNER e HIATT, 1999).

O baço dos animais tem uma grande importância como reservatório sanguíneo, podendo, quando solicitado e sobre ação das catecolaminas, elevar o hematócrito em até 10% do seu valor normal (KOLB et al., 1987; LIPOWITZ e BLUE, 1998). Além disso, está envolvido na produção de linfócitos T e B e de anticorpos (LIPOWITZ e BLUE, 1998; RICHARD e SHERIND, 1998; LIPOWITZ e BLUE, 1998). Nos recém nascidos, o baço tem função hematopoiética e, quando necessário, também pode produzir hemácias nos adultos (LIPOWITZ e BLUE, 1998).

A estrutura do baço, devido a sua malha tridimensional, realiza o monitoramento de células sanguíneas viáveis, favorecendo a fagocitose dos leucócitos, plaquetas e eritrócitos senis pelos macrófagos (ZHANG, 2001). O material, quando processado pela Hematoxilina e Eosina (H&E), apresenta grumos marrons de hemossiderina, uma massa rica em ferro, oriunda da hemoglobina (SWENSON e REECE, 1996; COUTO e HAMMER, 1997; CARLTON e MCGAVIN, 1998).

Nas lesões sangrantes do fígado, o bloqueio dos vasos torna-se necessário para facilitar as manobras cirúrgicas (SILVA JR. et al., 2002, ARAÚJO JR. et al 2005). Em 1908, Pringle já utilizava do clampeamento total do hilo hepático para conter hemorragias. O clampeamento total do pedículo hepático utilizado para conter a hemorragia nos procedimentos cirúrgicos do fígado resulta na congestão esplâncnica e, conseqüentemente,

perfusão sanguínea deficiente de órgãos como estômago, intestino delgado e parte anterior do intestino grosso, baço e pâncreas (SEBE, 1999a; FREITAS, 2000; CAMARGO; 2003). Esse procedimento resulta em hipóxia celular, aumento do metabolismo anaeróbico e formação de substâncias lesivas às células como prostaglandinas e radicais livres (superóxidos - O_2^- , peróxido de hidrogênio - H_2O_2 e hidroxil - OH^-) (FORYTH e GUILFORD, 1995).

As células necessitam de oxigênio para oxidar substratos energéticos por meio das enzimas citocromo oxidase. Para que essa reação ocorra, o oxigênio tem que receber quatro elétrons para ser reduzido em água. Caso ocorra redução do oxigênio por um elétron, será formado o radical superóxido (O_2^-). Já a redução de dois elétrons, resulta em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e a redução por três elétrons resulta no radical hidroxil (OH^-) (FLAHERTY e WEISFELDT, 1988). Esta redução do oxigênio por até três elétrons dá origem a produtos conhecidos como radicais livres do oxigênio. Tanto o radical superóxido quanto o hidroxil são altamente instáveis, podendo reagir com macromoléculas biológicas, alterando sua conformação e provocando danos celulares. O radical hidroxil é considerado o mais reativo, podendo reagir com moléculas de DNA. Embora o peróxido de hidrogênio seja considerado o menos potente, na presença de íons de metais como o ferro, o peróxido de hidrogênio pode ser convertido em radical hidroxil, tornando-se reativo (FLAHERTY e WEISFELDT, 1988).

Para melhorar estas condições, Barbarino et al.(1978) trabalharam em seus experimentos utilizando apenas o clampeamento isolado da veia porta. Essa técnica teve como finalidade diminuir o afluxo de sangue para o fígado e a congestão esplâncnica. Mesmo assim observaram esplenomegalia, com aumento da polpa vermelha, diminuição do número de folículos de Malpighi que se apresentaram aumentados de tamanho.

SEBE (1999), FREITAS (2000) e CAMARGO (2003) observaram que o clampeamento total do pedículo hepático, em ratos, por mais de vinte minutos, leva a congestão esplâncnica. A partir deste fato, propôs-se com este trabalho, avaliar as alterações morfológicas, morfométricas e ultra-estruturais do baço durante o clampeamento total do pedículo hepático (manobra de PRINGLE modificada).

3. OBJETIVOS

Avaliar os aspectos morfológicos, morfométricos e ultra-estruturais do baço de ratos após o clampeamento total do pedículo hepático em diferentes tempos.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Amostra

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus albinus*), da linhagem OUTB EPM-1, Wistar, machos, de três meses de idade e peso entre 232 e 359 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Universidade de Cuiabá (UNIC) e ficaram alojados em gaiolas de poliuretano com grade de aço, de 41 x 34 x 17 cm, em número de dois por gaiola, sendo a higienização destas realizada diariamente.

A temperatura foi mantida por ar condicionado em 22 °C, a umidade em 65% e a luminosidade foi controlada artificialmente com lâmpadas fluorescentes (luz do dia - Phillips – 40 Watts) com 12 horas de luz e 12 horas sem luz.

Utilizou-se ração Labina (Purina), própria para ratos e os animais foram mantidos em jejum alimentar de duas horas anteriores à cirurgia.

Os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de 10 animais, denominados grupo controle (C) e grupos experimentais (E₁, E₂ e E₃). Os procedimentos realizados em cada grupo de animais foram os seguintes:

Grupo C – animal anestesiado + celiotomia + retirada do baço após 30 minutos;

Grupo E₁ – animal anestesiado + celiotomia + clampeamento do pedículo hepático do 20º ao 30º minuto + retirada do baço;

Grupo E₂ – animal anestesiado + celiotomia + clampeamento do pedículo hepático do 10º ao 30º minuto + retirada do baço;

Grupo E₃ – animal anestesiado + celiotomia + clampeamento do pedículo hepático por 30 minutos + retirada do baço.

4.2. Procedimento

Os ratos foram trazidos ao Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UNIC, instantes antes do início do experimento e mantidos isolados em uma sala separada.

Após serem sorteados aleatoriamente, foram enquadrados em um dos quatro grupos, sendo etiquetados com um número de 1 a 10 e acrescida da letra de um dos quatro grupos (C, E₁, E₂ ou E₃).

Após o sorteio e identificação, os animais foram pesados e submetidos à anestesia dissociativa com 25 mg/Kg de xilazina¹ e 50 mg/Kg de cetamina². A via de administração foi intramuscular, na região posterior da coxa direita (Fig. 1).



Figura 1. Aplicação da associação anestésica pela via intramuscular na região posterior da coxa direita.

¹ Virbaxil 2% - Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP.

² Vetanarcol – Koning do Brasil Ltda, Florianópolis, SC.

Em seguida foram realizadas tosquiadas das regiões abdominais dos animais com máquina tosquiadeira (Fig. 2).



Figura 2. Animal sendo submetido à tosquia da região abdominal com máquina tosquiadeira.

Na sequência, os animais foram posicionados na mesa cirúrgica em decúbito dorsal, onde se procedeu anti-sepsia com iodo povidona³ (Fig. 3) e foram colocados campos operatórios (Fig. 4).



Figura 3. Anti-sepsia da região abdominal do animal com iodo povidona.

³ Riodeine tópico – Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda, São Paulo, SP.



Figura 4. Panos de campo colocados sobre o animal e fixados com pinças Backhaus.

Foi realizada uma incisão mediana pré-retro umbilical com lâmina de bisturi nº 11, partindo da cartilagem xifóide, se estendendo aproximadamente 4 cm caudal à cicatriz umbilical (Fig. 5). Após incisão da pele e divulsão do subcutâneo, realizou-se a abertura da parede abdominal com bisturi, ampliando a incisão com tesoura Metzenbaum (Fig. 6). Após a abertura da cavidade abdominal localizou-se o pedículo hepático (Fig. 7).

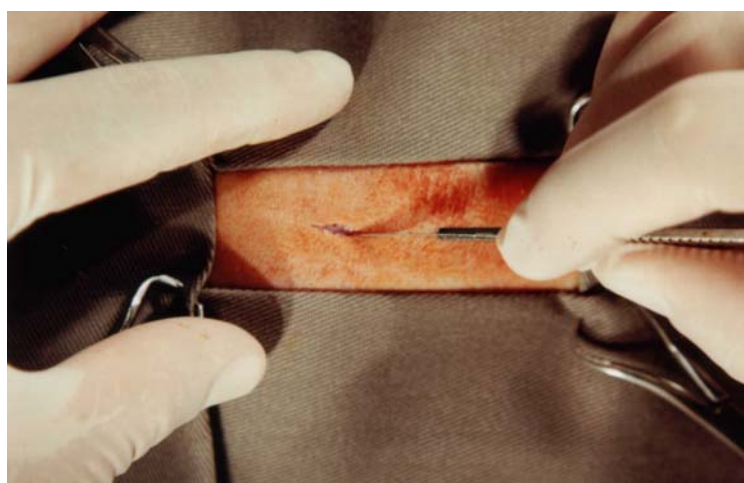


Figura 5. Incisão mediana pré-retro umbilical com bisturi.



Figura 6. Ampliação da incisão da cavidade abdominal com tesoura Metzenbaum.

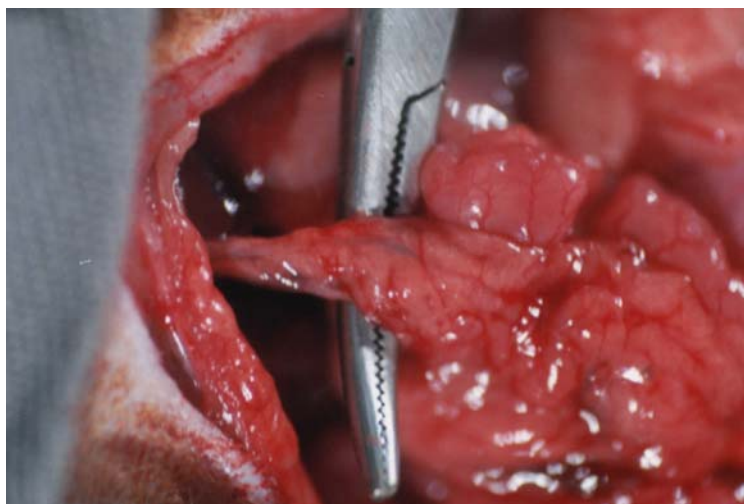


Figura 7. Apresentação do hilo hepático (sistema porta hepático).

A artéria hepática, a veia porta e o colédoco foram clampeados utilizando-se pinça de clampeamento vascular de 3 cm (Fig. 8).



Figura 8. Clampeamento do pedículo hepático com pinça vascular.

Em seguida as incisões foram cobertas com gazes embebidas em solução fisiológica a 0,9%⁴ aquecida para evitar a hipotermia e desidratação.

Os animais do grupo C foram anestesiados, e as celiotomia foram realizadas na sequência, porém não tiveram os pedículos hepáticos clampeados. Após 30 minutos seus baços foram coletados.

Os demais animais, em seus respectivos grupos, tiveram seus pedículos hepáticos clampeados por 10, 20 ou 30 minutos. Após cada tempo estipulado, os baço foram coletados, utilizando-se tesoura Metzenbaum. Foram seccionados todos os componentes do pedículo esplênico (Fig. 9).

⁴ Solução fisiológica – JP Indústria Farmacêutica SA, Ribeirão Preto, SP.

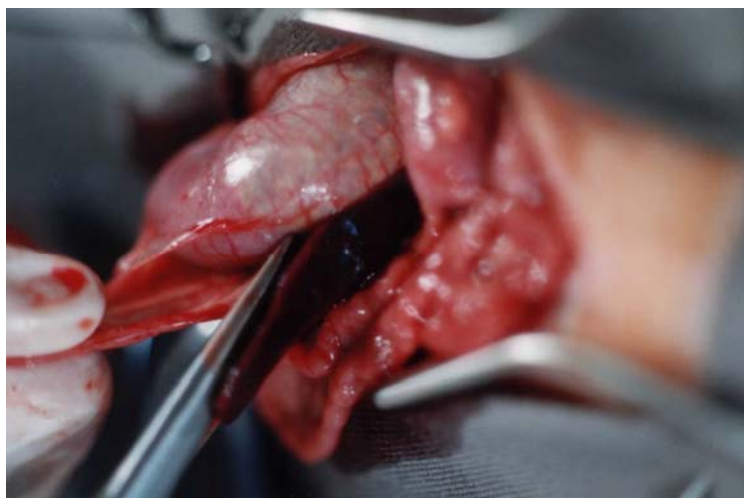


Figura 9 Coleta do baço após o clampeamento utilizando uma tesoura Metzenbaum.

Após remoções dos baços, fragmentos foram coletados e imediatamente mergulhados em solução de formaldeído a 10% ou em solução de glutaraldeído a 4%, tampão cacodilato.

Em seguida, os animais foram submetidos a eutanásia por aprofundamento anestésico e cloreto de potássio a 10%⁵.

4.3. Estudo Morfológico ao microscópio de luz

Fragmentos do terço médio dos baços que permaneceram durante 24 horas mergulhados em formol 10%, para fixação, foram submetidos às técnicas rotineiras para inclusão em parafina. Após fixação, o material foi desidratado em concentrações crescentes de álcool etílico (desde 70 GL até o absoluto ou 100°GL). Em seguida, foram submetidos à diafanização pelo xilol e impregnação em parafina líquida a 59 °C. Os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina de tal maneira que fosse possível observar, nas lâminas, cortes perpendiculares ao maior eixo dos fragmentos. Dos blocos foram realizados cortes de 5µm de espessura, com o auxílio de micrótomo rotativo MR2125 Leica, coletados em lâminas e corados pela Hematoxilina-Eosina (H.E). Alguns cortes de cada animal foram submetidos à metodologia citoquímica para identificação dos íons de ferro, pelo método de Perls (Ferrocianeto-Férrico), para estudo morfométrico. Neste método, o ferro da hemossiderina, em meio ácido, é liberado e vai combinar com ferrocianeto de potássio, formando o ferrocianeto férrico de coloração azul da prússia. As lâminas coradas pelo H.E foram analisadas em microscopia de luz (Axiolab 2.0 da Carl Zeiss) com objetivas que variavam de 4 a 100 X e ocular de 10X. O material foi fotografado em fotomicroscópio Olympus.

⁵ Cloreto de potássio 10% – Aster Produtos Médicos Ltda, Sorocaba, SP

4.4. Estudo Morfométrico

A análise morfométrica foi realizada nas lâminas submetidas à reação de Perls. Imagens foram inicialmente capturadas com o auxílio de um sistema de captura de imagens, que consiste em câmara digital de alta resolução (Axio Vision – Carl Zeiss) acoplada em microscópio de luz (Axiolab 2.0 - Carl Zeiss) sob objetiva de 40X. A imagem obtida foi transferida para computador Pentium 4.0 em ambiente Windows, contendo programa de captura de imagens (Rel 4.0 da Carl Zeiss). Em seguida, com o auxílio de um sistema computacional de análise de imagens (softwares IMAGELAB 2000), o material foi lido com intuito de analisar a porcentagem de área no corte que continha ferrocianeto férrico (resultado da reação de Perls). Para tanto, foram capturados 10 campos do baço em cada animal, na região imediatamente ao redor da polpa branca, ou seja, na região da polpa vermelha. Em cada campo foi obtido um valor (percentual) sendo, ao final, obtido um valor médio para cada animal.

4.5. Estudo ultra-estrutural

Para o estudo ultra-estrutural foram coletados fragmentos do terço médio do baço, que foram transformados em peças de aproximadamente 1mm^3 , imediatamente imersas em solução de glutaraldeído a 4,0% (0,32 osmolar), em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, em pH 7,2, à temperatura de 4 °C, por quatro horas. Em seguida, foram lavadas três vezes em solução salina a 0,9%, 0,32 osmolar e imersas em acetato de uranila a 0,5%, 0,32 osmolar, durante 12 horas, à 4°C. Logo após, as peças foram lavadas três vezes em água bidestilada e desidratadas pelo etanol em concentrações crescentes, seguida de duas passagens de 10 minutos cada uma, pelo óxido de propileno. Em seguida, foi feita infiltração, onde as peças ficaram em movimento giratório por uma hora, à temperatura ambiente, em mistura de óxido de propileno e meio de inclusão (araldite) 1:1. O material foi, então, transferido para o meio de inclusão, onde permaneceu girando por uma hora em estufa à 37°C. A inclusão das peças foi realizada em araldite e mantida em estufa à 60 °C, por 72 horas, para a polimerização da resina e preparo dos blocos, onde através de um ultramicrotomo Porter Blum MT - 1, foram conseguidos cortes semifinos de espessuras de 0,5 μm . As lâminas foram preparadas e coradas em mistura de partes iguais de Azur II a 1%, em água destilada e azul de metileno a 1%, em bórax a 1%, à quente. Em seguida, foram enxaguadas e examinadas ao microscópio de luz para selecionar os blocos que continham a polpa vermelha. Após estes procedimentos, os blocos foram selecionados e levados ao ultramicrotomo para obtenção de cortes ultrafinos, com espessura variando de 40 a 80 nm. Para obtenção dos cortes ultrafinos foram usadas facas de vidro e telas de cobre de 200 malhas. A análise dos cortes ultrafinos e de suas eletromicrografias foram realizadas em microscópio de marca Carl Zeiss, modelo EM 900 a 80kV.

Nas eletromicrografias foram observadas a morfologia geral da polpa vermelha, em especial dos macrófagos.

4.6. Análise estatística

Os dados da percentagem dos pigmentos férricos de hemossiderina foram submetidos inicialmente à análise de variância, complementados pelos testes de Kolmogorov-Smirnov, Levene e Welch e Brown-Forsythe (software - SPSS 15.0). O nível de significância máximo adotado foi $P < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1. Macroscopia

Após o período de clampeamento do hilo hepático observou-se que os baços de todos os grupos experimentais (E_1 , E_2 e E_3) mostraram coloração vermelho escuro a azulada, semelhantes aos grupo controle.

5.2. Microscopia de luz

No **Grupo Controle** foi observado baço circundado por uma cápsula de tecido fibromuscular que emite septos para o seu interior (trabéculas). No interior do órgão notou-se, no parênquima, a presença de acúmulos de linfócitos (polpa branca) que formam cordões ao redor de vasos sanguíneos ou nódulos com arteríola central. Ao redor dos nódulos linfáticos notaram-se inúmeros capilares contendo hemácias no seu interior (polpa vermelha), sendo os capilares rodeados por inúmeros macrófagos (cordões de Billrot). Alguns macrófagos apresentaram pequena quantidade de grânulos alaranjados (hemossiderina) no seu interior e, após a reação ao ferrocianeto de potássio (Reação de Perls), se observou pequena quantidade pigmentos férricos de coloração azulada (Fig. 10C e 11C, Tab. 2 e Graf. 1).

O **Grupo E_1** (10 minutos de clampeamento) apresentou uma arquitetura do baço muito semelhante ao Grupo Controle. Entretanto, observou-se ligeira vasodilatação nos capilares presentes na polpa vermelha e maior quantidade de grânulos azulados de hemossiderina que no Grupo C (Fig. 10 E_1 e 11 E_1 , Tab. 2 e Graf. 1).

No **Grupo E_2** (20 minutos de clampeamento) notou-se que o baço também apresentava a mesma arquitetura histológica daquela observada no grupo Controle. No entanto, percebeu-se nítida diminuição da polpa branca, tanto da porção cordonal quanto da nodular. A polpa vermelha mostrou-se bem evidente, com intensa dilatação dos capilares sinusóides e concentração acentuada de grânulos de hemossiderina (Fig. 10 E_2 e 11 E_2 , Tab. 2 e Graf. 1).

No **Grupo E_3** (30 minutos de clampeamento) foi observado acentuado aumento da polpa vermelha. A polpa branca encontra-se praticamente tomada pela polpa vermelha devido a acentuada dilatação dos vasos sanguíneos presentes nesta região e elevada concentração de grânulos de hemossiderina (Fig. 10 E_3 e 11 E_3 , Tab. 2 e Graf. 1).

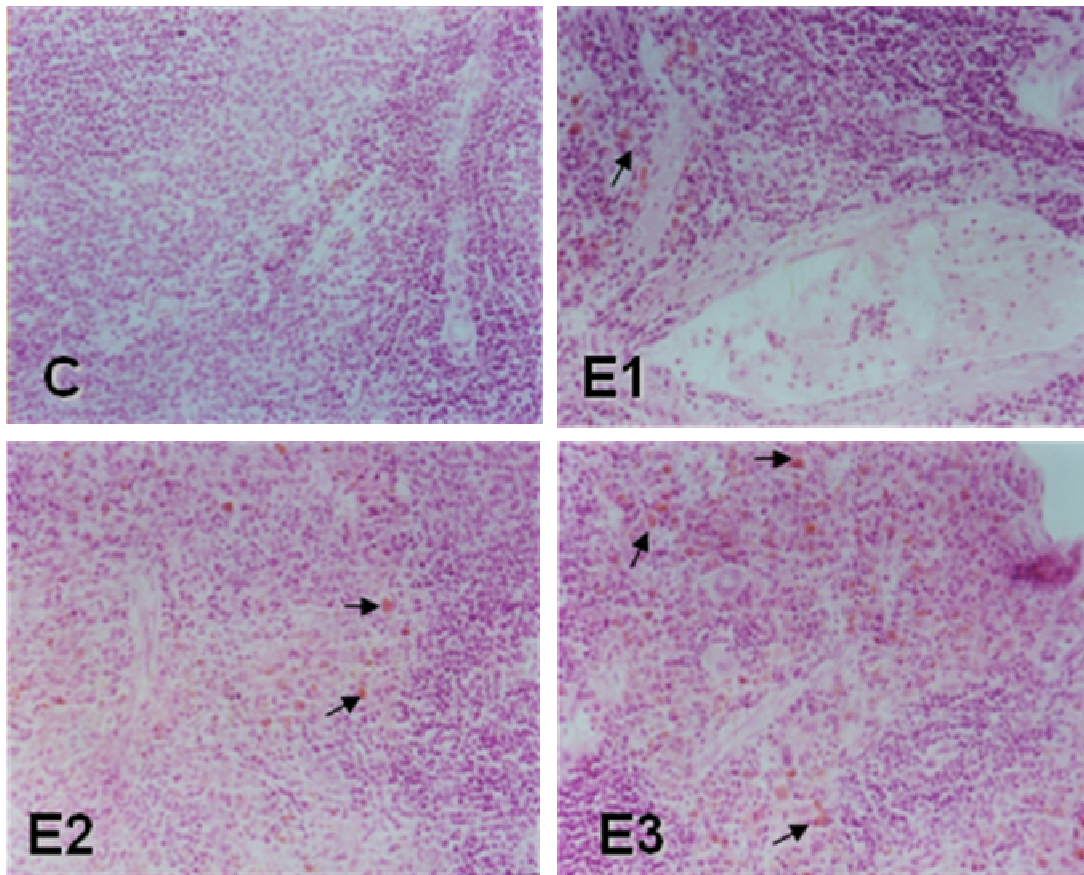


Figura 10. Fotomicrografias mostrando cortes histológicos de baços de ratos pertencentes aos vários grupos de estudo. Notar em C (Grupo Controle) polpa vermelha com poucos grânulos de hemossiderina, que no entanto, estão aumentados (setas) nos grupos E₁ (10 minutos), E₂ (20 minutos) e E₃ (30 minutos). H.E 10X.

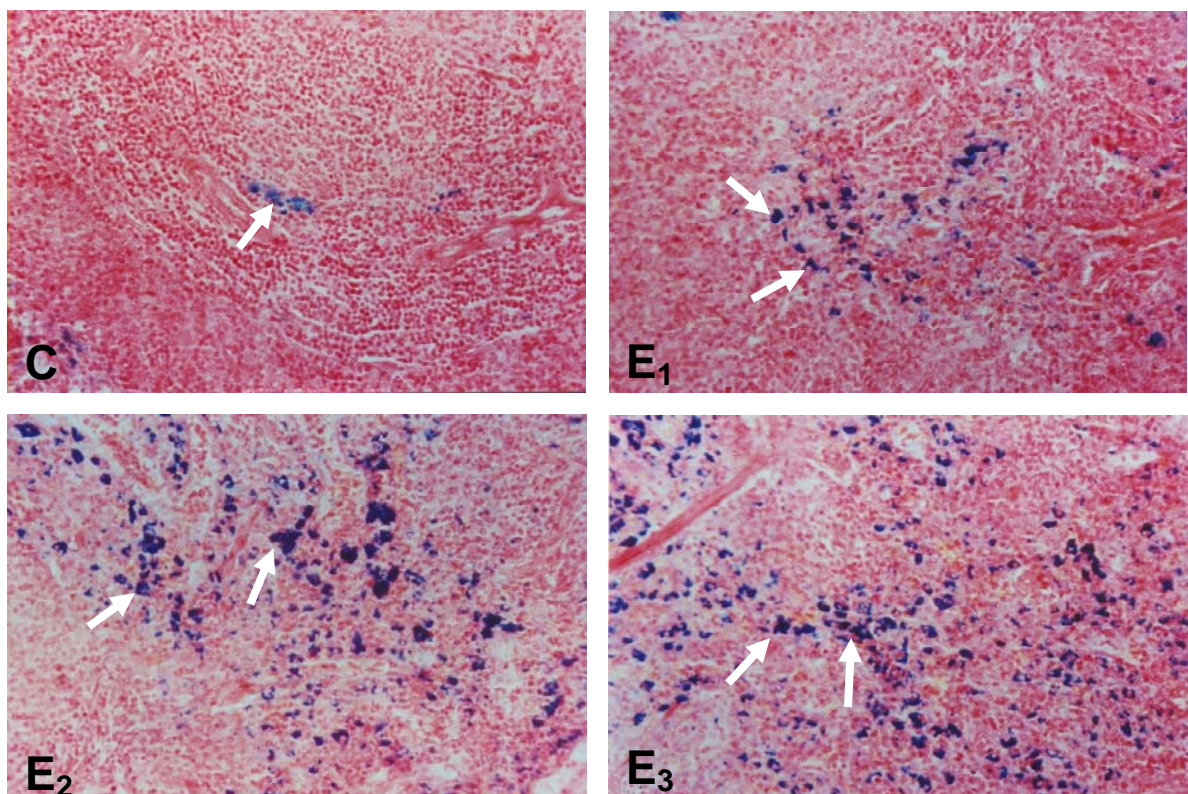


Figura 11. Fotomicrografias mostrando cortes histológicos de baços de ratos pertencentes aos vários grupos de estudo. Notar em C (grupo controle) pouca reatividade, que se acha aumentada, de forma acentuada e progressiva (setas), nos grupos E₁ (10 minutos), E₂ (20 minutos) e E₃ (30 minutos). Reação de Perls (Ferrocianeto-férrico) 10X.

5.3. Estudo morfométrico

Os dados relativos à análise morfométrica dos grânulos de hemossiderina encontram-se expressos na tabela 1 e 2 e gráfico 1.

Tabela 1. Porcentagem (%) da área ocupada pelos grânulos de hemossiderina na polpa vermelha dos baços pertencentes aos vários grupos (C, E₁, E₂ e E₃) de estudo após o clampeamento total do pedículo hepático.

GRUPOS			
C (%)	E ₁ (%)	E ₂ (%)	E ₃ (%)
1,2	2,2	5,4	12,5
2,2	1,3	7,5	15,4
1,3	2,1	5,7	17,8
1,4	2,1	4,5	16,5
1,5	1,1	3,2	18,9
1,4	2,1	5,6	15,7
1,3	2,5	4,5	16,7
1,3	2,3	5,4	18,5
1,5	2,0	3,2	18,9
1,4	1,8	4,2	19,6

Tabela 2. Porcentagem (%) de pigmento de hemossiderina (média \pm desvio padrão) obtida na polpa vermelha dos baços dos ratos pertencentes aos vários grupos (C, E₁, E₂ e E₃) após o clampeamento total do pedículo hepático.

Grupos	Controle (%)	E1 (%)	E2 (%)	E3 (%)
Médias	1,45 ^A	1,95 ^B	4,92 ^C	17,05 ^D
Desvio Padrão	0,28	0,44	1,29	2,15

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

Média \pm desvio padrão de E₃ > E₂ > E₁ > Grupo Controle.

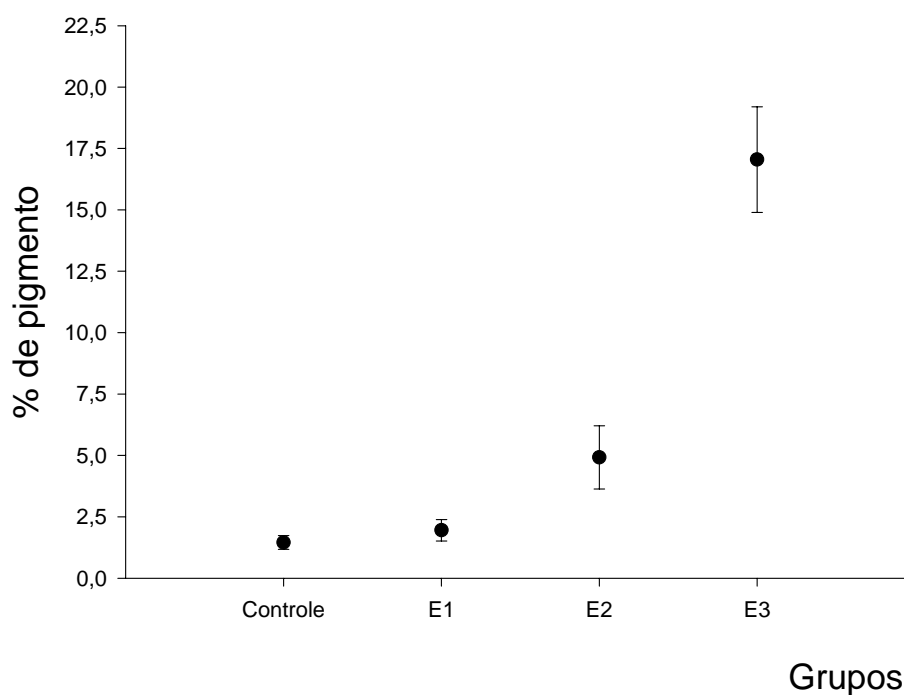


Gráfico 1. Porcentagem de pigmento de hemossiderina (média \pm desvio padrão) obtida na polpa vermelha dos baços dos ratos pertencentes aos vários grupos (C, E₁, E₂ e E₃) após o clampeamento total do pedículo hepático.

5.4. Microscopia eletrônica de transmissão

No **Grupo Controle** foram observados inúmeros macrófagos em contato com eritrócitos, sendo que alguns deles apresentavam no seu citoplasma alguns grânulos eletrondensos (Fig. 12C).

Nos **Grupos E₁, E₂ e E₃** notou-se intensa vasodilatação que se acentua com o decorrer do tempo de clampeamento e maior concentração de macrófagos contendo no seu interior inúmeros grânulos eletrondensos (Fig. 12 E₁, E₂ e E₃). Em alguns macrófagos notou-se que os grânulos eletrondensos estavam constituídos por restos de hemácias ou de células (Fig. 12E₁,E₂ e E₃).

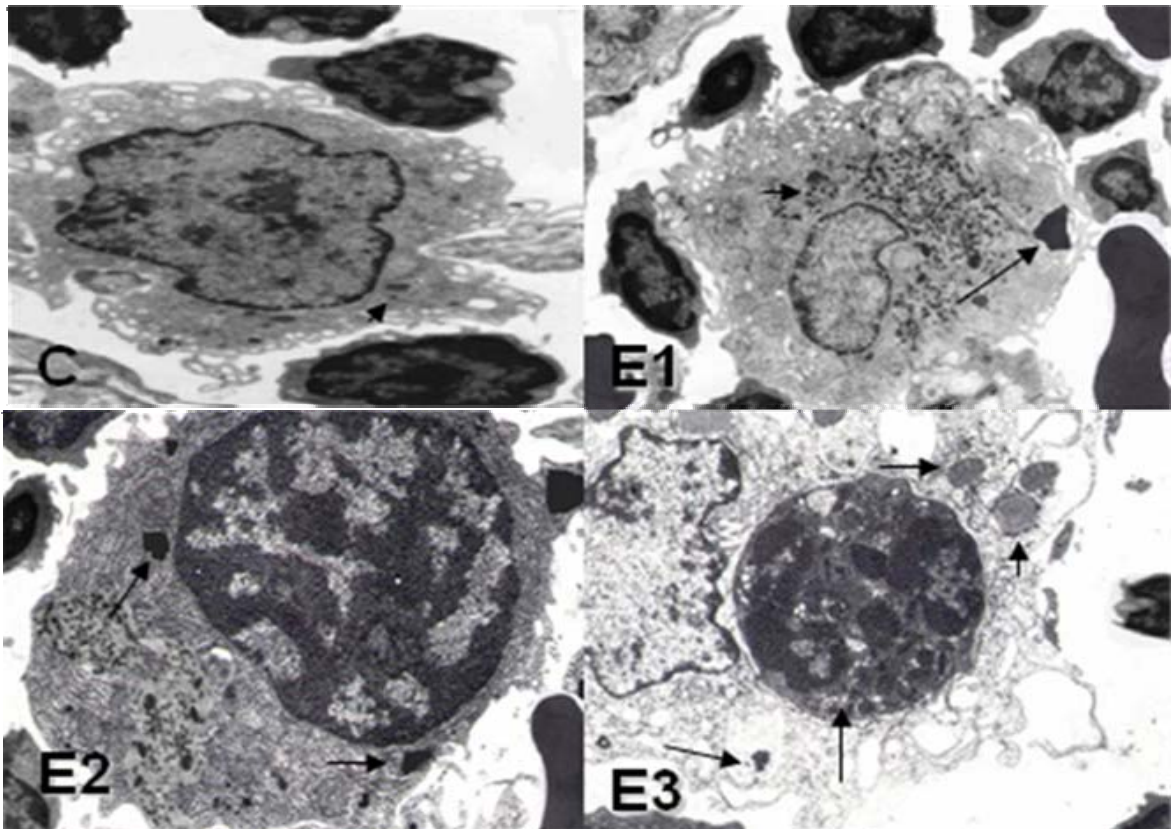


Figura 12. Eletromicrografias mostrando macrófagos presentes nos cordões de Billroth dos ratos pertencentes aos vários grupos (C, E₁, E₂ e E₃). Notar em C (Grupo Controle) poucos grânulos eletrondensos (seta), que aumentam em números (setas) com o decorrer do tempo de clampeamento hepático (E₁, E₂ e E₃). 8200X.

6. DISCUSSÃO

O rato foi o animal escolhido para a realização deste trabalho por ser de fácil aquisição, apresentar uma linhagem bem definida para se conseguir amostras de maior homogeneidade e por ser amplamente utilizado nesse tipo de experimento (SHIBAYAMA et al., 1991; HARDY et al., 1995; SEBE, 1999; CAMARGO et al., 2003).

Várias associações de tranquilizantes e anestésicos como midazolan e cetamina, medetomidina e cetamina, xilazina e cetamina, podem ser utilizadas para anestésiar animais de laboratório (HENS e BROSNAN, 1970; HORIUCHI et al., 1995 (SPINOSA et al., 1999; FREITAS et al., 2000; SEBE et al., 2000; CAMARGO, 2003; ISOZAKI et al., 1992). Neste experimento os barbitúricos foram evitados, uma vez que atuam na musculatura lisa da cápsula esplênica, causando relaxamento da mesma, aumentando, com isso, o reserva sanguínea esplênica, o que poderia interferir nos resultados durante o clampeamento do pedículo hepático, elevando a pressão sanguínea intra-esplênica e aumentando a fagocitose das hemácias pelos macrófagos (ETTINGER, 1996; CARLTON e MCGAVIN, 1998; FRASER, 1991). Sendo assim, foi empregada a associação de xilazina e cetamina, na mesma seringa, por via intramuscular, por ser de fácil aplicação, produzir analgesia, relaxamento muscular e anestesia nos animais durante o procedimento cirúrgico, sem que promovesse alterações hepáticas (WEISBROTH e FUDENS, 1972).

Vale lembrar que o ambiente onde os animais de laboratório são acomodados no período pré-operatório é um fator a ser considerado, pois existe interferência da resposta aos fármacos anestésicos frente a estímulos excitatórios externos (MASSONE, 2003). Diante do exposto, optou-se, neste estudo, por um período de adaptação dos animais em uma sala isolada, com ventilação e sem ruídos, de forma a obter uma anestesia satisfatória e livre de intercorrências durante todo experimento.

O acesso à cavidade abdominal mais comumente utilizado na literatura é pela linha mediana, partindo da cartilagem xifóide e estendendo-se em direção à cicatriz umbilical (FREDERIKS et al., 1982; ASAKAVA et al., 1989; ISOZAKI et al., 1995, GONCE et al., 1995; HARDY et al., 1995; MARUYAMA et al., 1995, SEBE et al., 2000). Esse tipo de incisão foi utilizada nos animais do experimento, possibilitando a visualização do hilo hepático, fígado e baço, facilitando o clampeamento do hilo hepático e avaliação direta do baço.

A torção esplênica primária ou secundária, decorrente da dilatação e vólvulo-gástrico, em pequenos animais, inicialmente promove a oclusão das veias de paredes

delgadas, mas não das artérias correspondentes, resultando em congestão, isquemia e, posteriormente, necrose do parênquima esplênico. A patogênese da torção ainda não está bem esclarecida, porém o grau de lesão esplênica irá depender do comprometimento dos vasos e do tempo de privação sanguínea para esse órgão (POPE e ROCHAT, 1996). Da mesma forma, neste estudo, a congestão esplênica observada após clampeamento total do pedículo hepático, não promoveu necrose, pois a obstrução vascular comprometeu apenas a circulação venosa, mantendo-se intacta a circulação arterial. Provavelmente, o tempo de clampeamento não foi suficiente para causar necrose deste órgão, embora tenha promovido congestão esplênica.

Silva Jr e Beer (1998), em seus modelos experimentais de isquemia hepática, utilizaram a manobra de Pringle, de maneira modificada, clampeando o tronco vascular e ducto biliar de determinado lobo hepático, não provocando, dessa forma, congestão esplênica. Já Gonzalez et al. (1979) e Frederiks et al. (1982) realizaram o clampeamento da artéria hepática esquerda, veia porta esquerda e ducto biliar esquerdo, causando isquemia no lobo mediano e lobo lateral esquerdo do fígado de ratos, mantendo-se, dessa maneira, uma parte do fígado funcional e evitando-se, então, a congestão esplênica. Derry e Slapak (1973) utilizando o clampeamento hepático seletivo, baseado na segmentação do fígado de ratos, propuseram um novo modelo de falência hepática aguda e, assim, conseguiram isquemiar 70% do órgão e manter 30% com circulação normal, não sendo necessário promover a decompressão vascular para impedir a congestão esplênica. Também, Omokava et al. (1991) em seu experimento, trabalharam com isquemia hepática, promovendo o desvio porto-sistêmico. O baço foi colocado na parede abdominal, sua cápsula foi escarificada e ele foi sepultado numa bolsa de tecido subcutâneo, produzindo assim a anastomose porto-sistêmica, com a finalidade de evitar a congestão esplênica.

Por outro lado, neste experimento foi utilizada a manobra de Pringle (1908) modificada, uma técnica que consiste no clampeamento do pedículo hepático (artéria hepática, veia porta e colédoco). Com essa técnica observou-se congestão esplênica, que resultou na congestão esplênica. Barbarino et al. (1978) já haviam utilizado apenas a ligação da veia porta e, observaram, em relação ao baço, esplenomegalia, aumento do diâmetro da polpa vermelha, diminuição do número de folículos de Malpighi, como pôde, também, ser observado neste trabalho. Da mesma forma, Sebe et al. (2000) e Camargo et al. (2003), em seus experimentos, observaram congestão esplênica, com mudança de coloração dos órgãos drenados pelo sistema porta.

De acordo com a literatura consultada, os períodos experimentais de tempo de isquemia hepática variam desde 30 minutos até 100 minutos (ASAKAVA et al., 1989; ISOZAKI et al., 1995), sendo os maiores períodos de tempo relacionados com trabalhos que envolvem isquemia hepática parcial ou total com derivações vasculares e os menores períodos de tempo relacionados com trabalhos que envolvem isquemia total, sem derivações vasculares, como descrito por Sébe (1999) e reproduzido neste estudo.

No modelo experimental realizado por Sébe (1999), Freitas et al. (2000) e Camargo et al. (2003), utilizando a manobra de Pringle modificada por 10, 20 e 30 minutos, notou-se isquemia hepática, intestinal e congestão esplênica, decorrentes da congestão esplâncnica. A isquemia hepática total em diferentes tempos, acarreta congestão esplâncnica e, conseqüentemente, congestão esplênica, que é caracterizada pela diminuição da polpa branca (nódulos linfáticos) e pelo aumento da polpa vermelha, sendo essa mais intensa aos trinta minutos, conforme relatada por Freitas et al. (2006) e confirmada através deste estudo.

A hemocaterese fisiológica de eritrócitos envelhecidos, lesionados ou enfermo, pelos macrófagos, libera grandes concentrações de ferro reutilizável, que é armazenado pelo baço e parte é direcionado à medula óssea para ser utilizado na produção de novas hemácias (POPE e ROCHAT, 1996; ALENCAR et al., 2002). Inicialmente, neste estudo, foi notado a presença de pigmentos férricos no parênquima esplênico que caracteriza a hemocaterese fisiológica, porém, com o aumento de tempo de clampeamento essa concentração aumentava.

O clampeamento do hilo hepático pode reduzir a concentração de energia e intensificar a acidose láctica esplênica, que poderá causar danos às membranas dos eritrócitos e alteração de sua elasticidade, aumentando a fagocitose das hemácias danificadas pelos macrófagos, resultando numa maior produção de pigmentos férricos de hemossiderina. Estas alterações ocorrem devido ao fato da concentração de glicose e colesterol nos seios venosos esplênicos ser menor se comparado ao restante do sistema circulatório, que juntamente com a produção de ácido láctico através do metabolismo das hemácias, resulta num ambiente tolerado apenas por hemácias jovens e saudáveis, levando ao descarte das hemácias velhas ou enfermas (POPE e ROCHAT, 1996). A presença de granulos de hemossiderina no parênquima esplênico caracteriza destruição de hemácias (FREITAS 2000), evento também notada nesse estudo, porém não se sabe se os pigmentos férricos são oriundos de hemácias jovens ou velhas e se realmente os tempos de clampeamentos foram suficientes para alterar, bioquimicamente, o baço

Também, o aumento da pressão sangüínea e da temperatura esplênica podem lesionar os eritrócitos e intensificar a eritrofagocitose pelos macrófagos (FRASER, 1986, POPE e

ROCHAT, 1996, CARLTON e McGAVIN, 1998). Desse forma, notou-se nesse experimento, que durante o clampamento do pedículo hepático, a drenagem venosa esplênica, realizada pelo sistema porta, ficou comprometida, caracterizada pela congestão esplênica, que possivelmente, acarreta um aumento da pressão sanguínea intraesplênica. O acúmulo progressivo de pigmentos férricos de hemossiderina observado no interior dos macrófagos, caracteriza a eritrofagocitose decorrente do aumento da pressão sanguínea no parênquima e seios venosos esplênicos.

Embora a reação de Perls ou azul da Prússia seja muito antiga, esta técnica ainda é muito utilizada nos dias atuais para identificação do ferro celular na forma de ferritina ou hemossiderina em várias patologias. A reação se processa na interação de íons ferrocianeto com íons férricos no interior da célula, resultando em um produto de cor azul-esverdeado denominado ferrocianeto férrico. Essa técnica é utilizada para detectar ferro no interior do eritroblasto (sideroblasto), de macrófagos e nas hemácias (ASANO et al., 2006; FREITAS et al., 2006; MEGURO et al., 2007). Por ser o baço um órgão que possui uma população muito grande de macrófagos que atuam na destruição das hemácias, principalmente as velhas ou danificadas, optou-se neste experimento, por utilizar essa técnica para detectar pigmentos férricos oriundos de eritrócitos no interior dos macrófagos.

A mensuração e a quantificação dos tecidos podem ser realizadas pela morfometria manual ou digital (HALASZ et al., 1993, VEIAGA et al., 2007). A quantificação morfométrica digital (Softwares IMAGELAB 2000), por ser um método prático e confiável, foi utilizada neste experimento, onde foi possível mensurar em porcentagem os pigmentos férricos de hemossiderina presentes nos macrófagos esplênicos em diferentes tempos.

Com relação à análise estatística da porcentagem de pigmentos férricos na polpa vermelha, o modelo adotado foi uma análise de variância de um fator. Entretanto, embora não rejeitada a hipótese de aderência à distribuição Normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov ($\alpha=0.365$), detectou-se heterogeneidade de variâncias pelo teste de Levene ($\alpha=0.000$), o que levou a optarmos por um procedimento não sensível a esta heterocedasticidade, no caso os testes de Welch e Brown-Forsythe (SOKAL e ROHLF, 1995). Após esta análise estatística foram observadas diferenças estatísticas entre todos os grupos.

Os oxirradicais livres (ânions hiperóxidos, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio) são moléculas altamente reativas e capazes de causar lesões celulares e no DNA. O peróxido de hidrogênio não é um radical livre, porém, com a produção acelerada e em presença de catalizadores metálicos como o ferro, através da reação de Haber-Weiss, formam radicais

hidroxila reativos (OH) (FLAHERTY e WEISFELDT, 1988; AMBRÓSIO et al., 2000; ALENCAR, et al.,2002, VALCARENGHI, 2006). Neste experimento, notou-se um aumento considerado de pigmentos férricos de hemossiderina, proporcionalmente ao tempo de clampeamento. Provavelmente, os pigmentos férricos contidos nos macrófagos, após o desclampeamento do hilo hepático possam adentrar a circulação e aumentar a produção de radicais livres, causando lesões às membranas celulares e, dependendo do grau destas lesões, levar a óbito o paciente no pós-operatório.

Conforme nota-se nas literaturas consultadas, é de interesse estudar as possíveis alterações que, eventualmente, possam ocorrer nos órgãos afetados pelo clampeamento do hilo hepático durante procedimentos cirúrgicos realizados no fígado. Baseado nos trabalhos de SEBE et al.(1999b) e CAMARGO (2004) que observaram alterações estruturais, por meio de microscopias de luz e eletrônica de transmissão, em nível das vilosidades intestinais e, também, congestão esplâncnica após clampeamento total do pedículo hepático, foi possível demonstrar, com este estudo, inúmeras alterações esplênicas, que salientam a necessidade de pesquisas complementares nesta área, principalmente no que tange sua proximidade à clínica médica-cirúrgica.

7. CONCLUSÃO

Os dados obtidos permitem concluir que 10 minutos de clampeamento total do pedículo hepático são suficientes para apresentar sinais de congestão esplênica e 20 e 30 minutos, promovem diminuição da polpa branca, dilatação dos capilares sinusóides, intensa digestão de hemácias pelos macrófagos, com presença de grânulos de ferro (hemossiderina) no parênquima esplênico.

8. REFERÊNCIAS

ALENCAR, N. X.; KOHAYAGAWA, A. CAMPOS, K.C.H. Metabolismo do ferro nos animais domésticos: revisão. **Revista de Educação Continuada**. v.5, p.196-205, 2002.

AMBRÓSIO, A.M.; FANTONI, D. T. MIGLIAT, E.R. Síndrome de isquemia e reperfusão em cães: revisão de literatura. **Clinica Veterinária**, n.24, p. 34-8, 2000.

ARAÚJO JÚNIOR, F. A; BRAZ, M. N; ROCHA NETO, O. G.; COSTA, F. D.; BRITO, M. V. H. Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirúrgica Brasileira**v.20 n.1, p.93-99, 2005.

ASAKAVA, H.; JEPPSON, B.; MACK, P.; HULTBERG, B.; HAGERTRAND, I.; BENGMARK, S. Acute ischemic liver failure in the rat: a reproducible model not requiring portal decompression. **European Surgical Research**, v.21, p.42-8, 1989.

ASANO, Y.; MEGURO, R; ODAGIRI, S, LI, C.; IWATSUKI, H.; SHOUMURA, K. Visualization of non-heme ferric and ferrous iron by highly sensitive non-heme iron histochemistry in the stress-induced acute gastric lesions in the rat. **Histochemistry Cell Biology**, v.125, n.5, p.515-525, 2006.

ATRES, M. M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan. 1991. p.89.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2ed. São Paulo: Manole. 1992. p.377-81.

BARBARINO, F.; NEUMANN, E.; TAMAS, S.; SUCIU, A.; ANDERCOU, A., ABRUDAN, O, DADEA, B. B. J. Mofologic, Histoenzymatic and radioisotopic changes in the liver after portal veins ligation. **Med Interne**, v. 16, p. 375-81, 1978.

BIER, O.; MOTA, I.; SILVA, W. D. **Imunologia básica aplicada**.4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam. 1989. p. 19-21.

BLUE, J.; WEISS, J. Vascular pathways in nonsinusal red pulp-an eletron microscopi study of the cat spleen. **American Journal of Anatomy**, v. 165, p. 115, 1981.

BURKITT, H, G.; YOUNG, B.; HEATH, J. W. **Weater histologia functional**. 3ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1994, p214-21.

CAMARGO, L. M.; EVÊNCIO NETO, J.; FREITAS, S. H.; SIMÕES, M. J.; GOMES, P. O.; SÉBE, A. A. Aspectos ultra-estruturais das vilosidades intestinais após o clampeamento do pedículo hepático de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n.6, p.509-513, 2003.

CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial**. 2ed. Porto Alegre: 1998. p.305, 349.

COUTO, C. G.; HAMMER, A. S. Afecções dos linfonodos e baço. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4ed. São Paulo: Manole. 1997. v.2, p.2684-2696.

DELLMANN, H. D.; BROWN, E. M. **Histologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1982. p.139-146.

DERRY, C. D.; SLAPAK, M. Proceedings: a new model for acute failure. **Britris Journal Surgery**, v. 60, p.901, 1973.

DOASSANS, C.; TORRES, M.; PRESSA, C. Vascularização esplênica. **Revista de Cirugia del Uruguay**, v. 54, p. 153-155, 1984.

EICHNER, R. R. Splenic funcion: normal, too much and too little. **The American Journal of Medicine**, v.66, p.311, 1979.

ETTINGER, S. J. **Manual de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1996. p. 853.

EVANS, H. E.; LAHUNTA, A. **Miller guia para dissecação do cão**. Rio de Janeiro, Guanabra Koogan. 1994. p.105.

FLAHERTY, J. T.; WEISFELDT, M. L. Reperfusion injury. **Free radical byology & medicine**, v.5, p.409-19, 1988.

FORSYTH, S. F.; GUILFORD, W.G. Ischemia-reperfusion injury: a small animal perspective. **British Veterinary Journal**, v.151. p.281-98, 1995.

FRASER, C. M. **Manual merck de veterinária**. 6ed. São Paulo: Roca, 1991. p. 26-27.

FREDERIKS, W. M.; JAMES, J.; BOSCH, K. S.; SCHRODER, M. J. R.; SCHUYT, H. C. A model for provoking ischemic necrosis in rat liver. Parenchyma and its quantitative analysis. **Experimental Pathology**, v.22, p.245-52, 1982.

FREITAS, S. H. ; EVENCIO NETO, J. ; SANTOS, M. D. ; SIMÕES, M. J. ; CAMARGO, L. M. ; RONDON, A. S. . **Avaliação qualitativa de pigmentos de hemossiderina em parênquima esplênico de ratos após o clampeamento da veia porta hepática**. In: XXXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, Cuiabá - MT., Anais... Cuiabá - MT, 2006, p.26.

FREITAS, S. H., SEBE, A. A., CAMARGO, L. M., SIMOES, M. J. Alterações esplênica em ratos após o clampeamento do pedículo hepático. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 66, (supl), p. 61, 1999.

FREITAS, S. H., SIMOES, M. J., CUBAS, J. J. M., SEBE, A. A., CAMARGO, L. M. Efeito do clampeamento temporário do pedículo hepático sobre a morfologia do baço de ratos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 67, (supl), p. 56, 2000.

GARTNER, L. P., HIATT, J. L. **Tratado de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 228-33.

GEORGE, L. L., ALVES, C. E. R., CASTRO, R. R. L. **Histologia comparada**. 2ed. São Paulo: Roca, 1998. p. 128-32.

GONCALEZ, Y., MACHADO, M. C.C., GONCALVES, E. L. Isquemia hepática e glicogênio-estudo experimental. **Revista do Hospital das Clínicas Faculdade De Medicina Universidade de São Paulo**, v. 34, p.74-9, 1979.

GONCE, M. E.; BRACKETT, D. J.; SQUIRES, R. A; GIBSON, D. D.; BALLA, A. K.; LERNER, M.R.; McCAY, P. B.; PENNINGTON, L. R. A new model for inducing total hepatic ischemia while preventing circulatory collapse. Secondary to splanchnic vascularcongestion. **Shock**, v.3, p.440-6, 1995.

GUYTON, A.C. **Tratado de fisiologia médica**. 8ed. Rio de Janeiro, Guanabara koogan, 1992, p. 147.

HALAZ, I.; AIRD, F.; LI, L.; PRYSTOWSKY, M. B.; REDEI, E. Sexually dimorphic effects of alcohol exposure in utero on neuroendocrine end immune functions in chronic alcohol-exposed adult rats. **Molecular Cellulae Neuroscience**, v.4, p.343-353,1993.

HARDY, K. J.; TANCHEROEN, S.; SHULKES, A. Comparison of continuous versus intermittent: reperfusion during liver resection in an experimental model, **Journal of Surgery**, v.82, p.833-36, 1995.

HORIUCHI, T; RYUSUKE, M; TABO, T; UCHINAMI, M, KIMURA, N.; TANIGAWA, N. Optimal cycles of hepatic ischemia and reperfusion for intermittent pedicle clamping during liver surgery. **Archives of Surgery**, v.130, p.754-58, 1995.

ISOZAKI, H.; ADAM, R.; GIGOU, M.; SZEKELY, A. M.; SHEN, M.; BISMUTH, H. Experimental study of the protective effect of intermittent hepatic pedicle clamping in the rat. **British Journal of Surgery**, v.79, p.310-13, 1992.

ISOZAKI, H.; OKAJIMA, K; KOBAYASHI, M.; HARA, H.; AKIMOTO, H. – experimental study of liver injury after partial hepatectomy with intermittent or continuous hepatic vascular occlusion. **European Surgical Research**, v.217, p.313-22, 1995.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p.237-242.

KOLB, E.; GURTLER, H.; KETZ, A; SCHRODER, L.; SEIDEL, H **Fisiologia veterinária**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1987, p.232, 238, 286, 471.

LIPOWITZ, A. J.: BLUE, I. Baço. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2ed. São Paulo: Manole. 1998, v.1, p.1143-1153.

MARQUES, R. G.; PETROIANU, A.; COELHO, JANICE M. C. O.; PORTELA, M. C. Morfologia e função fagocitária de implante esplênico autógeno regenerado em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.19, n.6, p.642-648, 2004.

MARUYAMA, H.; HARADA, A.; HUOKAWA, T.; KOBAYASHI, H.; NONAMI, T.; NAKAO, A.; TAKAGI, H. Duration of liver ischemia and hepatic regeneration after hepatectomy in rats. **Journal of Surgical Research**, v.58, p.290-94, 1995.

MASSONE, F. **Anestesiologia veterinária: farmacologia e técnicas**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, p.6.

MEGURO, R.; ASANO, Y.; ODAGIRI, S.; LI, C.; IWATSUKI, H.; SHOUMURA, K. Nonheme-iron histochemistry for light and electron microscopy: a historical, theoretical and technical review. **Archives of Histology and Cytology**, v.70, n.1, p.1-19, 2007.

OMOKAVA, S.; ARAI, Y.; SAITO.; FURUJA, T.; SATO.; SHIRAYAMA, K.; ITO, M.; ASANUMA, Y.; KOYAMA, K. A simple experimental model of total hepatectomy, hepatic ischemia and extrahepatic portal obstruction in rats using splenic transposition. **Japanese Journal Surgery**, v.21, p.50-6, 1991.

POPE, E. R; ROCHAT, M. C. Baço. In: BOJRAB, M. J. **Mecanismo da molestia na cirurgia dos pequenos animais**. 2ed. São Paulo: Manole. 1996. p.722-728.

PRINGLE, J. H. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. **Annals of Surgery**, v.48, p.541-49, 1908.

RICHARD, S. J.; SHERIND, R. G. **Clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca. 1998. p.206-207.

ROIT, I. M. **Imunologia**. 2ed. São Paulo: Manole. 1992. p.3.2-3.3.

SÉBE, A. A. **Efeitos de diferentes tempos de isquemia no fígado de ratos**. São Paulo: Universidade de São Paulo: Escola Paulista de Medicina. 1999. 90p. (Tese de Doutorado).

SÉBE, A. A., NIGRO, A. J. T., SIMOES, M. J., GOMES, P. O. Alterações nos intestinos de ratos após clampeamento do pedículo hepático, **Arquivos do Instituto Biológico**, v.66 (supl), p.61, 1999.

SEBE, A. A.; NIGRO, A. J. T.; GOMES, P. O. SIMÕES, M. J. Efeito do clampeamento do pedículo hepático nos intestinos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.15; n.1, p. 2000.

SHIBAYAMA, Y.; ASAKA, S.; NISHIJIMA, A. Mechanism of liver injury following ischemia. **Experimental and Molecular Pathology**, v.55, p.251-60, 1991.

SILVA JR., O. C., BEER JR., A. **Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia**. São Paulo: Robe, 1998. 840p.

SILVA JR., O. C; CENTURION, S.; EDUARDO G. PACHECO, E. G; BRI SOTTI, J. L.; OLIVEIRA, A. F.; DAL SASSO, K. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, suplemento 3, p. 96-100, 2002.

SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2ed. São Paulo: Manole. 1998. v.1. p.1151-1153.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**. 3ed. New York: W.H. Freeman and Company, 1995, 887p.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIAC, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 2ed. Rio de Janeiro. Guanabara Coogan. 1999. p.171.

STITES, D. P.; TERR, A.I.; PARLOW, T. G. **Medical immunology**. 9ed. Singapore: Appleton & Lange. 1997. p.55-59.

SWENSON, M. J.; REECE, W.O. **Dukes fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1996. p.35.

TIZARD, I. **Introdução a imunologia veterinária**. 2ed. São Paulo. Roca. 1985. p. 64-5.

VALCARENGHI, D. **Avaliação toxicológica crônica do polímero quitosana ferro (III) solúvel**. Santa Catarina: Universidade do Vale do Itajaí. 2006. 87p. (Dissertação de Mestrado).

VEIGA, R. K. A.; MELO-JUNIOR, M. R.; ARAUJO-FILHO, J. L.; MELLO, L. A.; PONTES-FILHO, N. T. Alterações morfométricas no timo, baço e placas de peyer durante a exposição pré e pós-natal ao álcool. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.IV, n.1, p.32-42, 2007.

WEISBROTH, S.H; FUDENS, J. H. Use of ketamine hydrochloride as an anesthetic in laboratory rabbits, rats, mice and guinea pigs. **Laboratory Animal Science**, v.22, p.904-06, 1972.

ZHANG, SHU-xin. **Atlas de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 152-57

ANEXOS
(Trabalhos enviados)

**ASPECTOS MACROSCÓPICOS, MORFOLÓGICOS E MORFOMÉTRICOS DO
BAÇO DE RATOS APÓS O CLAMPEAMENTO TOTAL DO PEDÍCULO
HEPÁTICO**

**MACROSCOPIC, MORPHOLOGIC AND MORPHOMETRIC ASPECTS OF THE
SPLEEN OF RATS AFTER TOTAL CLAMPING OF THE HEPATIC PEDICLE**

Silvio Henrique de Freitas¹; Joaquim Evêncio Neto²; Renata Gebara Sampaio Dória¹; Fábio de Souza Mendonça³; Manuel de Jesus Simões⁴; Lázaro Manoel de Camargo⁵; Abrão Antônio Sébe⁶

—

1. Professor do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Cuiabá – UNIC.
2. Professor Adjunto do Departamento de Morfologia e Fisiologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE.
3. Professor do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Cuiabá - UNIC.
4. Professor Livre Docente do Departamento de Morfologia da Universidade de Federal de São Paulo - ENIFESP-EPM.
5. Professor do Departamento de Clínica da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Cuiabá - UNIC.
6. Professor da Faculdade de Medicina da Universidade de Cuiabá – UNIC.

Silvio Henrique de Freitas. Av. Antártica, n^o 788, casa 26, Residencial Villas Boas, Ribeirão da Ponte, CEP 78040-500, Cuiabá – MT, Brasil, E-mail: shfreitas@terra.com.br, Telefone: (65) 36151222

RESUMO

Uma das complicações do clampeamento total do pedículo hepático é a congestão esplâncnica e, conseqüentemente, a congestão esplênica. Este trabalho teve como objetivo observar as alterações macroscópicas, morfológicas e morfométricas que ocorreram no baço frente à isquemia produzida pelo clampeamento do pedículo hepático. Para tanto foram utilizados 40 ratos machos, divididos em quatro grupos de 10 animais. O grupo controle (C) não foi submetido à isquemia, já os grupos experimentais (E₁, E₂ e E₃) foram submetidos ao clampeamento total por 10, 20 e 30 minutos, respectivamente. Após esses períodos, fragmentos do baço foram retirados e analisados histologicamente pela técnica de Hematoxilina-eosina e Ferrocianeto-férrico. Os resultados mostraram alterações microscópicas nos grupos E₁, E₂ e E₃, que permitem concluir que o clampeamento total do

pedículo hepático promove intensa congestão vascular, aumento de grânulos de hemossiderina, diminuição da polpa branca e aumento da polpa vermelha, sendo essas alterações mais intensas aos 30 minutos.

Palavras chave: Congestão, Hemossiderina, Baço, Rato.

ABSTRACT

One of the complications of hepatic pedicle total clamping is the splanchnic congestion and consequently a splenic congestion. The aim of this study was to observe the macro and microscopic alterations that occurred in the spleen during an ischemia produced by the hepatic pedicle clamping. Fourth male rats were divided in four groups of nine animals each. The control group (C) was not submitted to ischemia and the experimental groups (E₁, E₂ and E₃) were submitted to the total clamping during 10, 20 and 30 minutes, respectively. After these periods, spleen fragments were collected and histological analyzed by the eosin-hematoxilin and ferric ferrocyanide staining technique. The results showed microscopic alterations at the E₁, E₂ and E₃ groups that permitted to conclude that the total clamping of the hepatic pedicle promote intense vascular congestion, increase of the hemosiderin granules, decrease of the white pulp and increase of the red pulp, being these alterations more pronounced at the 30 minutes.

Keywords: Congestion, hemossiderina, spleen, rats.

INTRODUÇÃO

O baço é um órgão constituído por uma cápsula fibroelástica, de onde partem trabéculas que servem para conduzir vasos e nervos e por um estroma representado por uma rede de fibras e células reticulares que sustentam o parênquima ou polpa esplênica (polpas branca e vermelha) (EICHNER, 1979; BLUE e WEISS, 1981; DELLMANN e BROWN, 1982; STITES et al., 1997). A polpa branca é formada por um conjunto de nódulos linfáticos apresentando um centro germinativo e inúmeras células linfóides que se localizam ao longo das arteríolas esplênicas. Já a polpa vermelha representa a maior parte do baço, onde são observados inúmeros sinusóides sangüíneos que se entrelaçam e se anastomosam em várias direções, separados por cordões celulares esplênicos representados por fibroblastos, leucócitos, eritrócitos e macrófagos (DOASSAN et al., 1984; ATRES, 1991; BANKS, 1992; ROITT, 1992; POPE e ROCHAT, 1996).

O baço tem uma grande importância como reservatório sangüíneo, podendo, quando solicitado e sobre ação das catecolaminas, elevar o hematócrito em até 10% do seu valor normal. Possui função hematopoiética nos recém nascidos, podendo, também, desempenhar essa função nos adultos (LIPOWITZ e BLUE, 1998). A estrutura do baço, semelhante a uma peneira, torna-o eficiente no monitoramento de células sangüíneas viáveis, facilitando com isso a fagocitose destas pelos macrófagos. Estes acumulam pigmentos de hemossiderina, uma massa rica em ferro, oriunda da degradação da hemoglobina (SWENSON e REECE, 1996; COUTO e HAMMER, 1997; CARLTON e McGAVIN, 1998). Este órgão está, também, envolvido com os mecanismos de defesa do organismo, através da produção de linfócitos e anticorpos (LIPOWITZ e BLUE, 1998; RICHARD e SHERIND, 1998; SLATTER, 1998).

Em humanos, hemorragias hepáticas que ocorrem com freqüência após traumas decorrentes de transplantes e ressecções devem ser controladas; para tanto, diversas técnicas podem ser aplicadas. Inicialmente, Pringle (1908) utilizou o clampeamento total do hilo hepático para conter os casos de hemorragias hepáticas. Entretanto, Sébe (1999) trabalhando com clampeamento total do pedículo hepático em ratos, observou que a privação de sangue neste órgão, por mais de vinte minutos, leva a lesões nas organelas dos hepatócitos e, também, à congestão esplâncnica.

Na congestão esplâncnica decorrente do clampeamento total do pedículo hepático, ocorre aumento da pressão sangüínea do baço, elevando a eritrofagocitose, com significativa destruição de eritrócitos (FRASER, 1986; CARLTON e McGAVIN, 1998). O objetivo deste trabalho é a avaliação das possíveis alterações macroscópicas, morfológicas e morfométricas do baço durante o clampeamento total do pedículo hepático em diferentes tempos.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus albins*), Wistar, machos, com de três meses de idade e pesando entre 295 gramas. Os animais foram fornecidos pelo Biotério da Universidade de Cuiabá - UNIC e ficaram alojados em gaiolas de poliuretano com grade de aço, de 41 x 34 x 17 cm, em número de dois animais por gaiola. A temperatura ambiente foi mantida por condicionador de ar a 22°C, a umidade em 65% e a luminosidade controlada artificialmente com 12 horas de claro e 12 horas de escuro. As gaiolas foram higienizadas diariamente.

Os animais foram divididos em quatro grupos, denominados grupo controle (C) e grupos experimentos (E₁, E₂ e E₃). Todos os animais foram submetidos a um mesmo protocolo

anestésico, utilizando-se a associação de xilazina⁶ e cetamina⁷, na mesma seringa, nas dosagens de 25 mg/kg e 50 mg/kg, respectivamente, pela via intramuscular, na região posterior da coxa. Em seguida, foi realizada tricotomia da região abdominal ventral de cada animal e posicionamento em decúbito dorsal na mesa cirúrgica, quando foi realizada anti-sepsia com iodo polivinilpirrolidona⁸.

Após cinco minutos da anestesia, foi efetuada incisão mediana pré-retro umbilical, partindo da cartilagem xifóide até 4 cm caudal à cicatriz umbilical. Em seguida, foi realizada abertura da cavidade abdominal e, então, identificou-se o hilo hepático (artéria e veia hepática, a veia porta e o ducto hepático).

Nos animais do grupo C, não foi realizado clampeamento do hilo hepático, apenas os animais dos grupos experimentos tiveram seus pedículos clampeados, utilizando uma pinça de clampeamento vascular de 3 cm. Os animais do grupo C tiveram seus baços coletados após trinta minutos e os dos grupos experimentos (E₁, E₂ e E₃), tiveram seus pedículos clampeados por 10, 20 e 30 minutos, respectivamente. Após cada tempo pré-estabelecido, o baço foi coletado e analisado quanto a coloração e, então, os animais foram eutanasiados por aprofundamento do plano anestésico e cloreto de potássio a 10%⁹.

Em seguida, fragmentos esplênicos foram coletados e imediatamente mergulhados em solução de formaldeído a 10%, onde permaneceram por um período de 24 horas. Após esse período de fixação, foram feitas sucessivas trocas com álcool etílico a 70% progressivamente até 100°GL. Em seguida foram submetidos á técnicas de inclusão em parafina e realizados cortes de 5µm de espessura em micrótomo rotativo e corados pela Hematoxilina-Eosina (H.E) e pelo Ferrocianeto-Férrico (reação de Perls) e analisados em microscopia de luz e fotografados com fotomicroscópio Olympus.

Macroscopicamente, os baços foram analisados quanto à coloração. Os resultados microscópicos referentes à congestão esplênica foram avaliados pela técnica da hematoxilina-eosina e os resultados referentes à concentração de pigmentos férricos de hemossiderina pela análise morfométrica realizada nas lâminas submetidas à reação de Perls, onde as imagens foram inicialmente capturadas com o auxílio de um sistema captador de imagens, que consiste em câmara digital de alta resolução (Axio Vision – Carl Zeiss) acoplada em microscópio de luz (Axiolab 2.0 - Carl Zeiss) sob objetiva de 40X. A imagem obtida foi transferida para computador Pentium 4.0 em ambiente Windows, contendo programa de captura de imagens

⁶ Virbaxil 2% - Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP.

⁷ Vetanarcol – Koning do Brasil Ltda, Florianópolis, SC.

⁸ Riodeine tóxico – Indústria Farmacêutica Rioquímica Ltda, São Paulo, SP.

(Rel 4.0 da Carl Zeiss). Em seguida, com o auxílio de um sistema computacional de análise de imagens (softwares IMAGELAB 2000), o material foi lido com o intuito de analisar a porcentagem de área no corte que continha ferrocianeto férrico (resultado da reação de Perls). Para tanto, foram capturados 10 campos do baço em cada animal, na região imediatamente ao redor da polpa branca, ou seja, na região da polpa vermelha. Em cada campo foi obtido um valor porcentual sendo, ao final, obtido um valor médio para cada animal que foi, inicialmente, submetido a análise de variância e complementada pelos testes de Kolmogorov-Smirnov, Levene e Welch e Brown-Forsythe (software - SPSS 15.0). O nível de significância máximo adotado foi $P < 0,05$.

RESULTADOS

A) Macroscópicos

Após o período de clampeamento total do hilo hepático observou-se que os baços de todos os animais estudados mostraram coloração vermelho escuro a azulada, semelhante ao grupo controle.

B) Microscopia de luz

No **Grupo Controle** foi observado baço circundado por uma cápsula de tecido fibromuscular que emitia septos para o seu interior (trabéculas). No interior do órgão notou-se, no parênquima, a presença de acúmulos de linfócitos (polpa branca) que formam cordões ao redor de vasos sanguíneos ou nódulos com arteríola central. Ao redor dos nódulos linfáticos notaram-se inúmeros capilares contendo hemácias no seu interior (polpa vermelha), sendo os capilares rodeados por inúmeros macrófagos (cordões de Billrrot). Alguns macrófagos apresentaram pequena quantidade de grânulos alaranjados (hemossiderina) no seu interior e, após a reação ao ferrocianeto de potássio (Reação de Perls), se observou pequena quantidade pigmentos férricos de coloração azulada (Fig. 1C e 2C, Tab. 1 e Fig. 3).

O **Grupo E₁** (10 minutos de clampeamento) apresentou uma arquitetura do baço muito semelhante ao Grupo Controle. Entretanto, observou-se ligeira vasodilatação nos capilares presentes na polpa vermelha e maior quantidade de grânulos azulados de hemossiderina que no Grupo C (Fig. 1E₁ e 2E₁, Tab. 1 e Fig. 3).

No **Grupo E₂** (20 minutos de clampeamento) notou-se que o baço também apresentava a mesma arquitetura histológica daquela observada no grupo Controle. No

⁹ Cloreto de potássio 10% – Aster Produtos Médicos Ltda, Sorocaba, SP

entanto, percebeu-se nítida diminuição da polpa branca, tanto da porção cordonal quanto da nodular. A polpa vermelha mostrou-se bem evidente, com intensa dilatação dos capilares sinusóides e concentração acentuada de grânulos de hemossiderina (Fig. 1E₂ e 2E₂, Tab. 1 e Fig. 3).

No **Grupo E₃** (30 minutos de clampeamento) foi observado acentuado aumento da polpa vermelha. A polpa branca encontra-se praticamente tomada pela polpa vermelha devido a acentuada dilatação dos vasos sanguíneos presentes nesta região e elevada concentração de grânulos de hemossiderina (Fig. 1E₃ e 1E₃, Tab. 1 e Fig. 3).

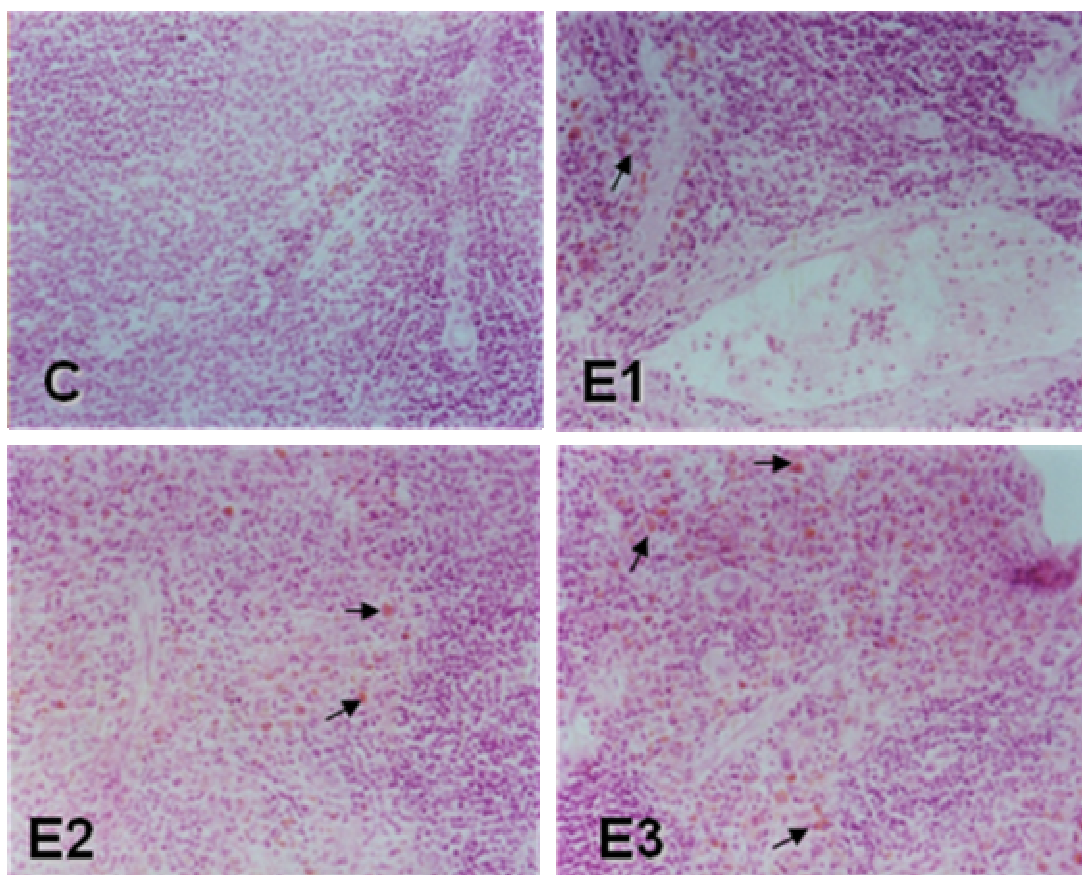


Figura 1. Fotomicrografias mostrando cortes histológicos de baços de ratos pertencentes aos vários grupos de estudo. Notar em C (Grupo Controle) polpa vermelha com poucos grânulos de hemossiderina, que no entanto, estão aumentados (setas) nos grupos E₁ (10 minutos), E₂ (20 minutos) e E₃ (30 minutos). H.E, objetiva 10X.

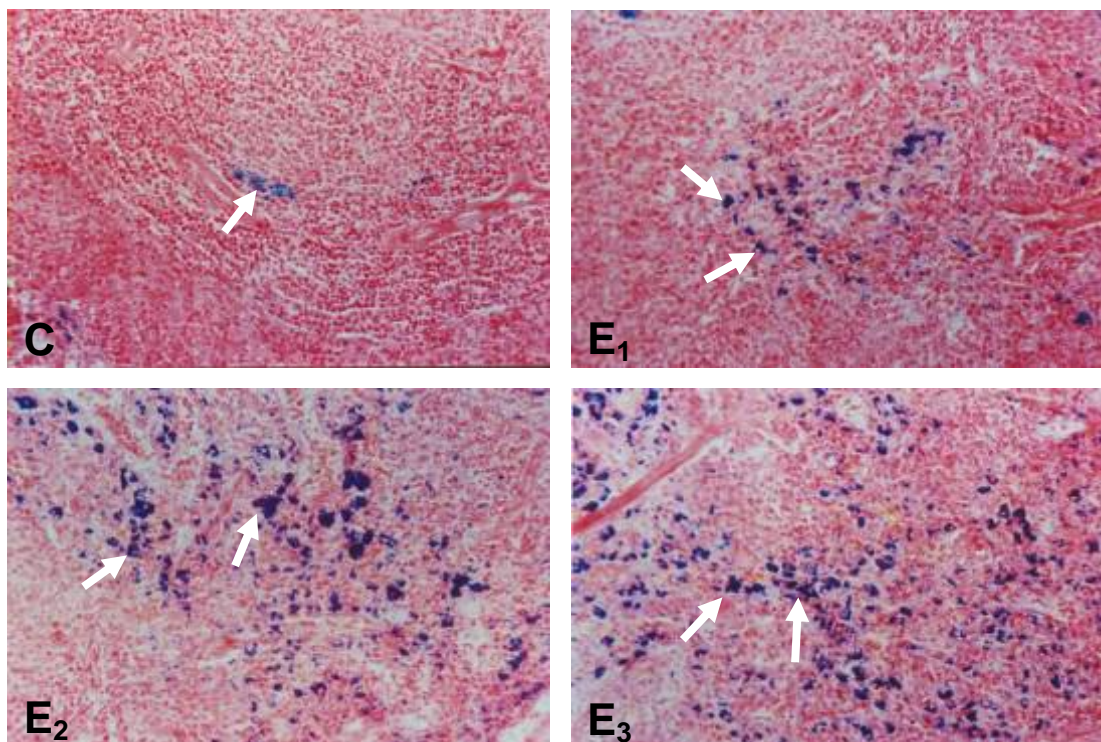


Figura 2. Fotomicrografias mostrando cortes histológicos de baços de ratos pertencentes aos vários grupos de estudo. Notar em C (grupo controle) pouca reatividade, que se acha aumentada, de forma acentuada e progressiva (setas), nos grupos E₁ (10 minutos), E₂ (20 minutos) e E₃ (30 minutos). Reação de Perls (Ferrocianeto-férrico), objetiva 10X.

B.1. Estudo morfométrico

Os dados relativos à análise morfométrica dos grânulos de hemossiderina encontram-se expressos na tabela 1 e gráfico 1.

Tabela 1. Porcentagem (%) de pigmento de hemossiderina (média \pm desvio padrão) obtida na polpa vermelha dos baços dos ratos pertencentes aos vários grupos (C, E₁, E₂ e E₃) após o clampeamento total do pedículo hepático.

Grupos	Controle (%)	E1 (%)	E2 (%)	E3 (%)
Médias	1,45 ^A	1,95 ^B	4,92 ^C	17,05 ^D
Desvio Padrão	0,28	0,44	1,29	2,15

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

Média \pm desvio padrão de E₃ > E₂ > E₁ > Grupo Controle.

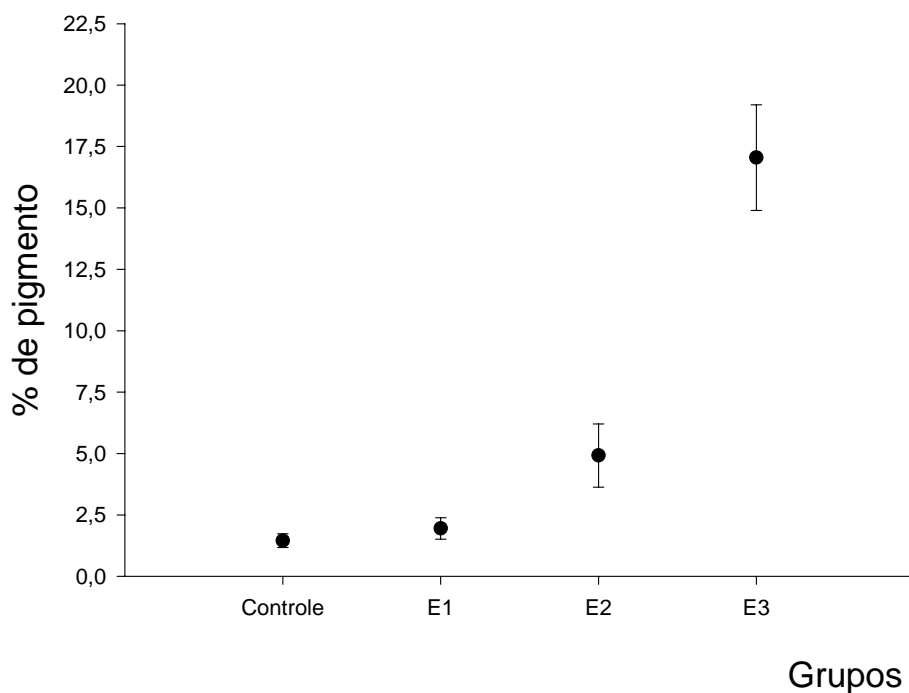


Figura 3. Porcentagem de pigmento de hemossiderina (média \pm desvio padrão) obtida na polpa vermelha dos baços dos ratos pertencentes aos vários grupos (C, E₁, E₂ e E₃) após o clampeamento total do pedículo hepático.

DISCUSSÃO

O acesso à cavidade abdominal, baço e hilo hepático foi realizado pela linha mediana, utilizando os mesmos procedimentos sugeridos por FREDERIKS et al. (1982), ASAKAVA et al., (1989), ISOZAKI et al. (1995) e GONCE et al. (1995). Para produzir congestão esplâncnica que resultasse em congestão do baço, neste estudo foi utilizada a manobra sugerida por PRINGLE (1908), que consiste no clampeamento do hilo hepático (artéria e veia hepática, veia porta e ducto biliar).

A isquemia total hepática por diferentes períodos de tempo, acarreta congestão esplâncnica (SEBE, 1999) e, conseqüentemente, congestão esplênica, que é caracterizada pela diminuição da polpa branca (nódulos linfáticos) e pelo aumento da polpa vermelha, sendo essa progressiva e mais intensa aos trinta minutos, conforme relatada por FREITAS et al. (1999) e demonstrado neste trabalho, através da microscopia de luz que confirmou acentuada dilatação dos vasos sanguíneos e a elevada concentração de grânulos de hemossiderina no parênquima esplênico.

Embora a reação de Perls ou azul da Prússia seja muito antiga, esta técnica ainda é muito utilizada nos dias atuais para identificação do ferro celular na forma de ferritina ou hemossiderina em várias patologias. A reação se processa na interação de íons ferrocianeto com íons férricos no interior da célula, resultando em um produto de cor azul-esverdeado denominado ferrocianeto férrico. Essa técnica é utilizada para detectar ferro no interior do eritroblasto (sideroblasto), de macrófagos e nas hemácias (ASANO et al., 2006; FREITAS et al., 2006; MEGURO et al., 2007). Por ser o baço um órgão que possui uma população muito grande de macrófagos que atuam na destruição das hemácias, principalmente as velhas ou danificadas, optou-se neste experimento, por utilizar essa técnica para detectar pigmentos férricos oriundos de eritrócitos no interior dos macrófagos.

A mensuração e a quantificação dos tecidos podem ser realizadas pela morfometria manual ou digital (HALASZ et al., 1993, VEIAGA et al, 2007). A quantificação morfométrica digital (Softwares IMAGELAB 2000), por ser um método prático e confiável, foi utilizada neste experimento, onde foi possível mensurar em porcentagem os pigmentos férricos de hemossiderina presentes nos macrófagos esplênicos em diferentes tempos.

Conforme descrito por FREITAS et al. (2000), através da técnica do ferrocianeto-férrico, este trabalho demonstrou acúmulo de pigmentos férricos (hemossiderina) no parênquima esplênico de maneira progressiva em relação ao tempo de clampeamento do pedículo hepático. Sabe-se que a reação da hemossiderina com o peróxido de hidrogênio (reação de Fenton) produz hidroxil, substância altamente lesiva para as células (FLAHERTY

e WEISFELDT, 1988; ROCHAT, 1991, CHUA-ANUSORN, 1999, MARX e HIDER, 2002, VACARENGHI, 2006). Da mesma forma, durante o clampeamento total do pedículo hepático, haverá uma perfusão deficiente de órgãos como estômago, intestino delgado e parte anterior do intestino grosso, pâncreas, fígado e baço. Esta baixa concentração de oxigênio celular (isquemia) pode promover aumento do metabolismo anaeróbico e formação de substâncias lesivas, como as prostaglandinas e radicais livres (superóxidos - O_2^- , peróxido de hidrogênio - H_2O_2 e hidroxil - OH^-) (FORYTH e GUILFORD, 1995), sugerindo a necessidade de novos trabalhos que estudem as lesões promovidas pela reperfusão deste órgão.

CONCLUSÕES

Este estudo demonstra que o clampeamento total do pedículo hepático promove, de maneira progressiva, congestão esplênica com redução da polpa branca e aumento da polpa vermelha, caracterizado por acentuada dilatação dos vasos sanguíneos e da concentração de grânulos de hemossiderina.

BIBLIOGRAFIAS

ASANO, Y.; MEGURO, R.; ODAGIRI, S.; LI, C.; IWATSUKI, H.; SHOUMURA, K. Visualization of non-heme ferric and ferrous iron by highly sensitive non-heme iron histochemistry in the stress-induced acute gastric lesions in the rat. **Histochemistry Cell Biology**, v.125, n.5, p.515-525, 2006.

ASAKAVA, H.; JEPPSON, B.; MACK, P.; HULTBERG, B.; HAGERTRAND, I.; BENGMARK, S. Acute ischemic liver failure in the rat: a reproducible model not requiring portal decompression. **European Surgical Research**, v. 21, p 42-8, 1989.

ATRES, M.M. **Fisiologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, p.89.

BANKS, W. J. **Histologia veterinária aplicada**. 2ed. São Paulo: Manole, 1992, p.377-81.

BLUE, J.; WEISS, J. Vascular pathways in nonsinusal red pulp-an electron microscopi study of the cat spleen. **American Journal of Anatomy**, v. 161, p. 135-168, 1981.

CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial**. 2ed. Porto Alegre: *editora*1998. p.305, 349.

CHUA-ANUSORN, W. The effect of prolonged iron loading on the chemical form of iron oxide deposits in rat liver and spleen. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1454, p.191-200, 1999.

COUTO, C. G.; HAMMER, A. S. Afecções dos linfonodos e baço. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. *Tratado de medicina interna veterinária*. 4ed. São Paulo: Manole. 1997. v.2, p.2684-2696.

DELLMANN, H. D.; BROWN, E. M. *Histologia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1982. p.139-146.

DOASSANS, C.; TORRES, M.; PRESSA, C. Vascularização esplênica. *Revista de Cirurgia del Uruguay*. v.54, p. 153-155, 1984.

EICHNER, R. R. Splenic function: normal, too much and too little. *The American Journal of Medicine*, v. 66, p.311, 1979.

FORSYTH, S. F.; GUILFORD, W.G. Ischemia-reperfusion injury – a small animal perspective. *British Veterinary Journal*, v.151. p.281-98, 1995.

FRASER, C. M. *Manual merck de veterinária*. 6ed. São Paulo: Roca, 1991. p. 26-7.

FREDERIKS, W. M.; JAMES, J.; BOSCH, K. S.; SCHRODER, M. J. R.; SCHUYT, H. C. A model for provoking ischemic necrosis in rat liver.Parenchyma and its quantitative analysis. *Experimental Pathology*, v.22, p.245-52, 1982.

FREITAS, S. H., SEBE, A. A., CAMARGO, L. M., SIMOES, M. J. Alterações esplênica em ratos após o clampeamento do pedículo hepático. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 66, (supl), p. 61, 1999.

FREITAS, S. H., SIMOES, M. J., CUBAS, J. J. M., SEBE, A. A., CAMARGO, L. M. Efeito do clampeamento temporário do pedículo hepático sobre a morfologia do baço de ratos. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 67, (supl), p. 56, 2000.

FREITAS, S. H. ; EVENCIO NETO, J. ; SANTOS, M. D. ; SIMÕES, M. J. ; CAMARGO, L. M.; RONDON, A. S. . **Avaliação qualitativa de pigmentos de hemossiderina em parênquima esplênico de ratos após o clampamento da veia porta hepática.** In: XXXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, Cuiabá - MT., Anais... Cuiabá - MT, 2006, p.26.

GONCE, M. E.; BRACKETT, D. J.; SQUIRES, R. A; GIBSON, D. D.; BALLA, A. K.; LERNER, M.R.; McCAY, P. B.; PENNINGTON, L. R. A new model for inducing total hepatic ischemia while preventing circulatory collapse. Secondary to splanchnic vascular congestion. *Shock*, v.3, p.440-6, 1995.

GURTLER, H. - *Fisiologia veterinária*. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1987, p. 238, 286.

HALAZ, I.; AIRD, F.; LI, L.; PRYSTOWSKY, M. B.; REDEI, E. Sexually dimorphic effects of alcohol exposure in utero on neuroendocrine and immune functions in chronic alcohol-exposed adult rats. *Molecular Cellulose Neuroscience*, v.4, p.343-353,1993.

ISOZAKI, H.; ADAM, R.; GIGOU, M.; SZEKELY, A. M.; SHEN, M.; BISMUTH, H. Experimental study of the protective effect of intermittent hepatic pedicle clamping in the rat. *Britis. Journal Surgery*, v.79, p.310-313, 1992.

ISOZAKI, H.; OKAJIMA, K; KOBAYASHI, M.; HARA, H.; AKIMOTO, H. Experimental study of liver injury after partial hepatectomy with intermittent or continuous hepatic vascular occlusion. *European Surgical Research*, v.217, p.313-22, 1995.

LIPOWITZ, A. J.: BLUE, I. Baço. In: SLATTER, D. *Manual de cirurgia de pequenos animais*. 2ed. São Paulo: Manole. 1998, v.1, p.1143-1153.

MARTINI, R. B.; GIMÉSEZ, P. P.; GIL, O. A.; RIBICHINI, J. J. Delimitación cromática para esplenectomia segmentaria. Hemostasia comparativa por electrocoagulación y laser de CO₂. *Revista Argentina de. Cirurgia*, v.63, p.32-36, 1992.

MARX, J.; HIDER, R. Iron: an essential but potentially harmful nutrient. *European Journal of Investigation*, v. 32, supl.1, p.1-2, 2002.

MEGURO, R.; ASANO, Y.; ODAGIRI, S.; LI, C.; IWATSUKI, H.; SHOUMURA, K. Nonheme-iron histochemistry for light and electron microscopy: a historical, theoretical and technical review. **Archives of Histology and Cytology**, v.70, n.1, p.1-19, 2007.

OMOKAVA, S.; ARAI, Y.; SAITO, S.; FURUJA, T.; SATO, S.; SHIRAYAMA, K.; ITO, M.; ASANUMA, Y.; KOYAMA, K. A simple experimental model of total hepatectomy, hepatic ischemia and extrahepatic portal obstruction in rats using splenic transposition. **Japanese Journal Surgery**, v.21, p.50-6, 1991.

POPE, E. R.; ROCHAT, M. C. Baço. In: BOJRAB, M. J. **Mecanismo da molestia na cirurgia dos pequenos animais**. 2ed. São Paulo: Manole. 1996. p.722-728.

PRINGLE, J. H. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. **Annals of Surgery**, v.48, p.541-49, 1908.

RICHARD, S. J.; SHERIND, R. G. - **Clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca. 1998. p.206-207.

ROIT, I. M. **Imunologia**. 2ed. São Paulo: Manole. 1992. p.3.2-3.3.

ROSKOSKI, R. JR. **Bioquímica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.15.

SÉBE, A. A. *Efeitos de diferentes tempos de isquemia no fígado de ratos*. São Paulo: Universidade de São Paulo: Escola Paulista de Medicina. 1999. 90p. (Tese de Doutorado).

SHIBAYAMA, Y.; ASAKA, S.; NISHIJIMA, A. – Mechanism of liver injury following ischemia. **Experimental and Molecular Pathology**, v.55, p251-60, 1991.

SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2ed. São Paulo: Manole. 1998. v.1. p.1151-1153.

STITES, D. P.; TERR, A.I.; PARLOW, T. G. **Medical immunology**. 9ed. Singapore: Appleton & Lange. 1997. p.55-59.

SWENSON, M. J.; REECE, W.O. *Dukes fisiologia veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1996. p.35.

VALCARENGHI, D. *Avaliação toxicológica crônica do polímero quitosana ferro(III) solúvel*. Santa Catarina: Universidade do Vale do Itajaí. 2006. 87p. (Dissertação de Mestrado).

VEIGA, R. K. A.; MELO-JUNIOR, M. R.; ARAUJO-FILHO, J. L.; MELLO, L. A.; PONTES-FILHO, N. T. Alterações morfométricas no timo, baço e placas de peyer durante a exposição pré e pós-natal ao álcool. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.IV, n.1, p.32-42, 2007.

**ASPECTOS MORFOLÓGICOS, MORFOMÉTRICOS E ULTRA- ESTRUTURAIS
DO BAÇO DE RATOS APÓS O CLAMPEAMENTO TOTAL DO PEDÍCULO
HEPÁTICO**

**MORPHOLOGIC, MORPHOMETRIC AND ULTRASTRUCTURAL ASPECTS OF
THE SPLEEN OF RATS AFTER TOTAL CLAMPING OF THE HEPATIC PEDICLE**

Silvio Henrique de Freitas - Professor do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Cuiabá – UNIC. Av. Antártica, n° 788, casa 26, Residencial Villas Boas, Ribeirão da Ponte, CEP 78040-500, Cuiabá – MT, Brasil, e-mail: shfreitas@terra.com.br, telefone: (65) 36151222

Joaquim Evêncio Neto - Professor Adjunto do Departamento de Morfologia e Fisiologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE.

Renata Gebara Sampaio Dória - Professora do Departamento de Clínica e Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Cuiabá - UNIC.

Fábio de Souza Mendonça - Professor do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Cuiabá - UNIC.

Manuel de Jesus Simões - Professor Livre Docente do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de São Paulo - ENIFESP-EPM.

Lázaro Manoel de Camargo - Professor do Departamento de Clínica e Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Cuiabá - UNIC.

Abrão Antônio Sebe - Professor da Faculdade de Medicina da Universidade de Cuiabá – UNIC.

RESUMO

Uma das complicações do clampeamento total do pedículo hepático é a congestão esplâncnica e, conseqüentemente, a congestão esplênica. Este trabalho teve como objetivo avaliar as alterações morfológicas, morfométricas e ultra-estruturais que ocorreram no baço frente à isquemia produzida pelo clampeamento total do pedículo hepático. Para tanto foram utilizados 40 ratos machos, divididos em quatro grupos de 10 animais. O grupo controle (C) não foi submetido à isquemia, já os grupos experimentais (E₁, E₂ e E₃) foram submetidos ao clampeamento por 10, 20 e 30 minutos, respectivamente. Após esses períodos, fragmentos do baço foram retirados e analisados histologicamente pela técnica de Hematoxilina-Eosina, Ferrocianeto-Férrico e microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados mostraram alterações microscópicas nos grupos E₁, E₂ e E₃ que permitem concluir que 10 minutos de clampeamento do pedículo hepático são suficiente para apresentar sinais de congestão esplênica e 20 e 30 minutos promovem intensa digestão de hemácias pelos macrófagos, com presença de grânulos de ferro (hemossiderina) no parênquima esplênico.

Palavras chave: Congestão, Hemossiderina, Baço, Rato, Ultra-estrutura.

ABSTRACT

One of the complications of hepatic pedicle total clamping is the splanchnic congestion and consequently a splenic congestion. The aim of this study was to evaluate the macro and microscopic alterations that occurred in the spleen during an ischemia produced by the hepatic pedicle total clamping. Fourty male rats were divided in four groups of ten animals each. The control group (C) was not submitted to ischemia and the experimental groups (E₁, E₂ and E₃) were submitted to the clamping during 10, 20 and 30 minutes, respectively. After these periods, spleen fragments were collected and histological analyzed by the eosin-hematoxilin and ferric ferrocyanide staining technique. Based on the results it is possible to conclude that 10 minutes of hepatic pedicle total clamping is sufficient to show signs of splenic congestion and 20 and 30 minutes promote intense red blood cells digestion by the macrophages with the presence of iron granules (hemosiderin) at the splenic parenchyma.

Keyword: Congestion, Hemosiderin, Spleen, Rat, Ultrastructure.

INTRODUÇÃO

Nas lesões sangrantes do fígado, o bloqueio dos vasos torna-se necessário para facilitar as manobras cirúrgicas (SILVA JR. et al., 2002; ARAÚJO JR. et al, 2005). Pringle (1908) realizou clampeamento total do hilo hepático para conter hemorragias hepáticas. Barbarino et al. (1978) trabalharam em seus experimentos utilizando apenas o clampeamento isolado da veia porta. Essa técnica teve como finalidade diminuir o fluxo de sangue para o fígado e a congestão esplâncnica. Mesmo assim observaram esplenomegalia, com aumento da polpa vermelha, diminuição do número de folículos de Malpighi que se apresentaram aumentados de tamanho. Porém, Sebe (1999), Freitas et al. (1999; 2000) e Camargo et al. (2003) demonstraram que o clampeamento total do pedículo hepático utilizado para conter a hemorragia nos procedimentos cirúrgicos do fígado resulta na congestão esplâncnica e, conseqüentemente, perfusão sanguínea deficiente de órgãos como estômago, intestino delgado e parte anterior do intestino grosso, pâncreas e baço.

O baço dos animais tem uma grande importância como reservatório sangüíneo, podendo, quando solicitado e sobre ação das catecolaminas, elevar o hematócrito em até 10% do seu valor normal (KOLB et al., 1987; LIPOWITZ e BLUE, 1998). Nos recém nascidos, o baço tem função hematopoiética e, quando necessário, também pode produzir hemácias nos adultos (LIPOWITZ e BLUE, 1998). Além disso, está envolvido na produção de linfócitos T e B e de anticorpos (LIPOWITZ e BLUE, 1998; RICHARD e SHERIND, 1998).

A estrutura do baço, devido a sua malha tridimensional, realiza o monitoramento de células sangüíneas viáveis, favorecendo a fagocitose dos leucócitos, plaquetas e eritrócitos senis pelos macrófagos (ZHANG, 2001). Sendo assim, hemácias velhas ou parasitadas, por perderem a sua flexibilidade e por não conseguirem penetrar nos sinusóides, são fagocitadas e destruídas pelos macrófagos (hemocaterese). Esses macrófagos, que são células muito ativas, possuem à microscopia eletrônica uma superfície irregular, com inúmeras saliências e reentrâncias e um citoplasma contendo vários lisossomos que depositam suas enzimas nos vacúolos que contém material fagocitado, formando os fagossomos, onde vai ser realizada a digestão do material fagocitado (GEORGE et al., 1998; GARTNER e HIATT, 1999; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). A hemoglobina resultante da digestão de hemácias se desdobra em porções heme e globina. A fração globina é quebrada em seus constituintes de aminoácidos que vão para circulação sanguínea e as moléculas de ferro, da fração heme, no interior dos macrófagos, se agrupam formando um pigmento denominado de hemossiderina que são levados à medula óssea pela transferrina, onde são utilizadas para formação de novas hemácias (SWENSON e REECE, 1996; COUTO e HAMMER, 1997; CARLTON e MCGAVIN, 1998; GEORGE et al., 1998; GARTNER e HIATT, 1999, ALENCAR et al., 2002).

A partir destes fatos, propôs-se com este trabalho, avaliar as alterações morfológicas, morfométricas e ultra-estruturais do baço durante o clampeamento total do pedículo hepático (manobra de Pringle modificada).

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados 40 ratos Wistar, machos, três meses de idade e peso variando de 232 a 359 gramas. Os animais ficaram alojados em gaiolas, com temperatura ambiente mantida por ar condicionado em 22 °C, umidade em 65% e luminosidade controlada artificialmente com lâmpadas fluorescentes (luz do dia - Phillips – 40 Watts), com 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

Após jejum alimentar de duas horas, os animais foram divididos aleatoriamente em quatro grupos de 10 animais, denominados grupo controle (C) quando foram realizadas anestesia dissociativa (25 mg/Kg de xilazina¹⁰ e 50 mg/Kg de cetamina¹¹, intramuscular), celiotomia e retirada do baço após 30 minutos, sem clampeamento do pedículo hepático e grupos experimentais (E₁, E₂ e E₃), quando foram realizadas anestesia, celiotomia e retirada do baço após 10, 20 e 30 minutos de clampeamento total do pedículo hepático (artéria hepática, veia porta e colédoco).

Após remoções dos baços, fragmentos foram coletados e imediatamente mergulhados em solução de formaldeído 10% ou em solução de glutaraldeído 4%, tampão cacodilato. Em seguida, os animais foram eutanasiados com o mesmo padrão de anestesia e, na sequência, cloreto de potássio a 10%¹².

Fragmentos do terço médio dos baços, que permaneceram durante 24 horas mergulhados para fixação, foram submetidos às técnicas rotineiras para inclusão em parafina e coloração pela Hematoxilina-Eosina (H.E), sendo analisados em microscopia de luz (Axiolab 2.0 da Carl Zeiss), com objetivas que variavam de 4 a 100 X e ocular de 10X.

Alguns cortes de cada animal foram submetidos à metodologia citotóxica para identificação dos íons de ferro, pelo método de Perls (Ferrocianeto-Férrico), para estudo morfométrico. Imagens foram inicialmente capturadas com o auxílio de um sistema de captura de imagens, que consiste em câmara digital de alta resolução (Axio Vision – Carl Zeiss) acoplada em microscópio de luz (Axiolab 2.0 - Carl Zeiss) sob objetiva de 40X. A imagem obtida foi transferida para computador Pentium 4.0 em ambiente Windows, contendo programa de captura de imagens (Rel 4.0 da Carl Zeiss). Em seguida, com o auxílio de um sistema computacional de análise de imagens (softwares IMAGELAB 2000), o material foi lido com intuito de analisar a porcentagem de área no corte que continha ferrocianeto férrico (resultado da reação de Perls). Para tanto, foram capturados 10 campos do baço em cada animal, na região imediatamente ao redor da polpa branca, ou seja, na região da polpa vermelha. Em cada campo foi obtido um valor (percentual) sendo, ao final, obtido um valor médio para cada animal.

Para o estudo ultra-estrutural foram coletados fragmentos do terço médio do baço, imediatamente imersas em solução de glutaraldeído 4,0% (0,32 osmolar), em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, em pH 7,2, à temperatura de 4 °C, por quatro horas e, a seguir,

¹⁰ Virbaxil 2% - Virbac do Brasil Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, SP.

¹¹ Vetanarcol – Koning do Brasil Ltda, Florianópolis, SC.

¹² Cloreto de potássio 10% – Aster Produtos Médicos Ltda, Sorocaba, SP

processados para observação em microscópio eletrônico de transmissão Carl Zeiss, modelo EM 900, sob tensão de 80kV.

Nas eletromicrografias foram observadas a morfologia geral da polpa vermelha, em especial dos macrófagos.

Os dados da porcentagem dos pigmentos férricos de hemossiderina foram submetidos inicialmente à análise de variância, complementados pelos testes de Kolmogorov-Smirnov, Levene e Welch e Brown-Forsythe (software - SPSS 15.0). O nível de significância máximo adotado foi $P < 0,05$.

RESULTADOS

Macroscopicamente, após o período de clampeamento do hilo hepático observou-se que os baços de todos os grupos experimentais (E_1 , E_2 e E_3) mostraram coloração vermelho escuro a azulada, semelhantes aos grupo controle.

No Grupo Controle foi observado baço circundado por uma cápsula de tecido fibromuscular que emite septos para o seu interior (trabéculas). No interior do órgão notou-se, no parênquima, a presença de acúmulos de linfócitos (polpa branca) que formam cordões ao redor de vasos sanguíneos ou nódulos com arteríola central. Ao redor dos nódulos linfáticos notaram-se inúmeros capilares contendo hemácias no seu interior (polpa vermelha), sendo os capilares rodeados por inúmeros macrófagos (cordões de Billroth). Alguns macrófagos apresentaram pequena quantidade de grânulos alaranjados (hemossiderina) no seu interior e, após a reação ao ferrocianeto de potássio (Reação de Perls), se observou pequena quantidade pigmentos férricos de coloração azulada (Fig. 1C e 2C, Tab. 1 e Graf. 1).

O Grupo E_1 (10 minutos de clampeamento) apresentou uma arquitetura do baço muito semelhante ao Grupo Controle. Entretanto, observou-se ligeira vasodilatação nos capilares presentes na polpa vermelha e maior quantidade de grânulos azulados de hemossiderina que no Grupo C (Fig. 1E₁ e 2E₁, Tab. 1 e Graf. 1).

No Grupo E_2 (20 minutos de clampeamento) notou-se que o baço também apresentava a mesma arquitetura histológica daquela observada no grupo Controle. No entanto, percebeu-se nítida diminuição da polpa branca, tanto da porção cordonal quanto da nodular. A polpa vermelha mostrou-se bem evidente, com intensa dilatação dos capilares sinusóides e concentração acentuada de grânulos de hemossiderina (Fig. 1E₂ e 2E₂, Tab. 1 e Graf. 1).

No Grupo E_3 (30 minutos de clampeamento) foi observado acentuado aumento da polpa vermelha. A polpa branca encontra-se praticamente tomada pela polpa vermelha devido

a acentuada dilatação dos vasos sanguíneos presentes nesta região e elevada concentração de grânulos de hemossiderina (Fig. 1E₃ e 2E₃, Tab. 1 e Graf. 1).

Os dados relativos à análise morfométrica dos grânulos de hemossiderina encontram-se expressos na tabela 1 e gráfico 1.

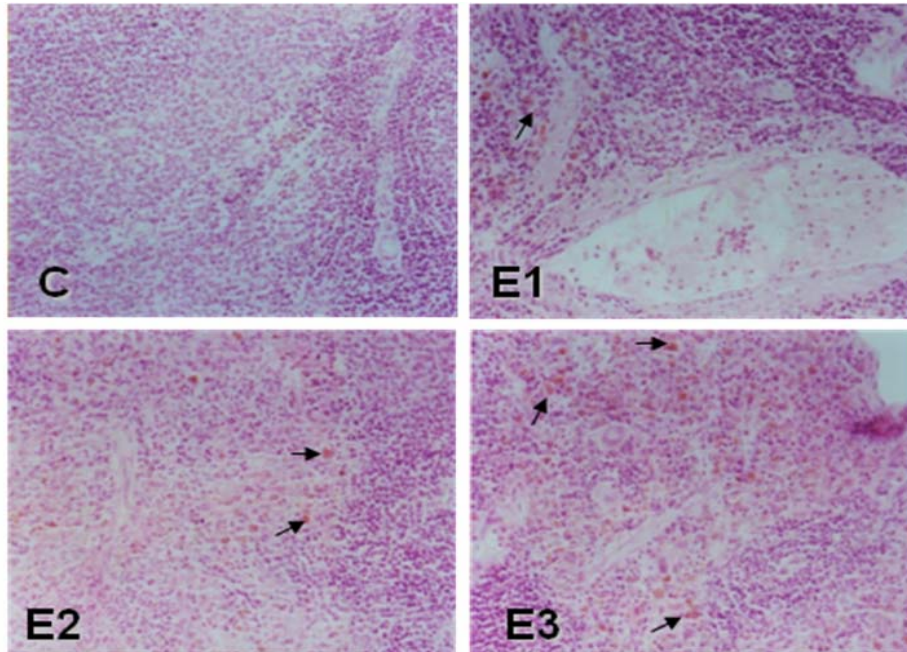


Figura 1. Fotomicrografias mostrando cortes histológicos de baços de ratos pertencentes aos vários grupos de estudo. Notar em C (Grupo Controle) polpa vermelha com poucos grânulos de hemossiderina, que no entanto, estão aumentados (setas) nos grupos E₁ (10 minutos), E₂ (20 minutos) e E₃ (30 minutos). H.E 10X.

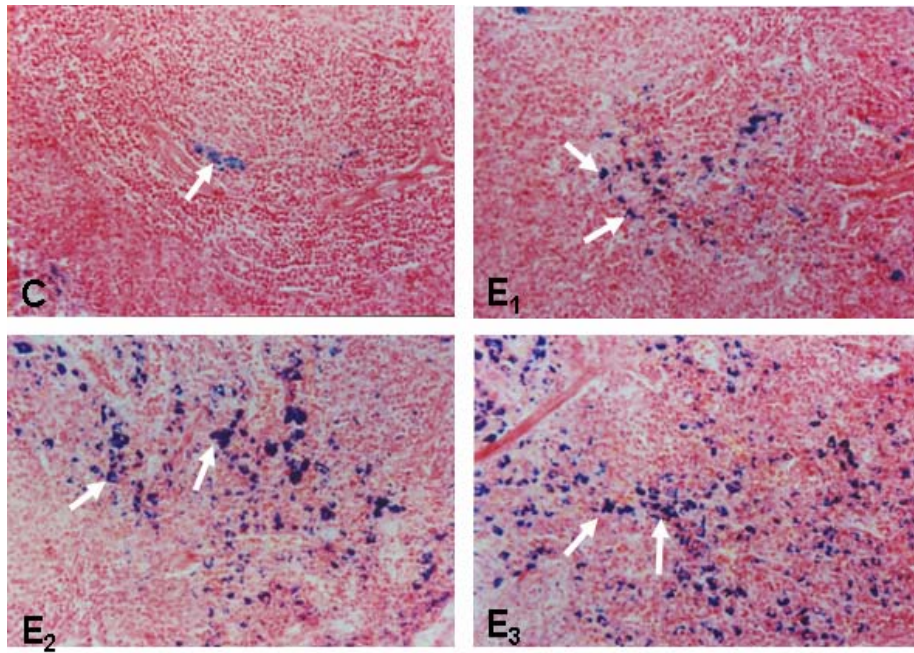


Figura 2. Fotomicrografias mostrando cortes histológicos de baços de ratos pertencentes aos vários grupos de estudo. Notar em C (grupo controle) pouca reatividade, que se acha aumentada, de forma acentuada e progressiva (setas), nos grupos E₁ (10 minutos), E₂ (20 minutos) e E₃ (30 minutos). Reação de Perls (Ferrocianeto-férrico) 10X.

Tabela 1. Porcentagem (%) de pigmento de hemossiderina (média \pm desvio padrão) obtida na polpa vermelha dos baços dos ratos pertencentes aos vários grupos (C, E₁, E₂ e E₃) após o clampeamento total do pedículo hepático.

Grupos	Controle (%)	E1 (%)	E2 (%)	E3 (%)
Médias	1,45 ^A	1,95 ^B	4,92 ^C	17,05 ^D
Desvio Padrão	0,28	0,44	1,29	2,15

Médias seguidas de letras diferentes diferem entre si ($p < 0,05$).

Média \pm desvio padrão de E₃ > E₂ > E₁ > Grupo Controle.

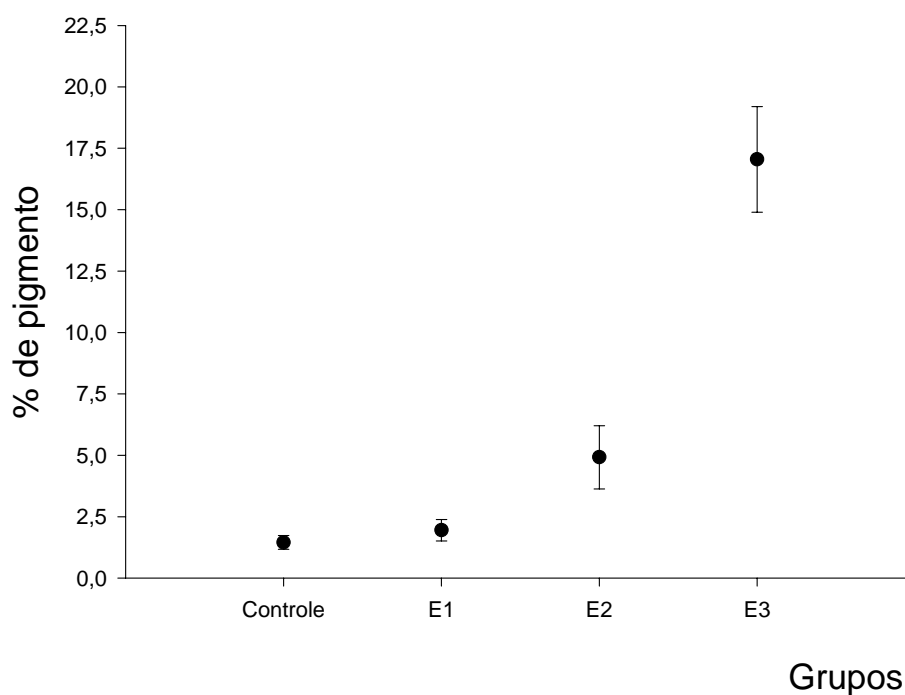


Gráfico 1. Porcentagem de pigmento de hemossiderina (média \pm desvio padrão) obtida na polpa vermelha dos baços dos ratos pertencentes aos vários grupos (C, E₁, E₂ e E₃) após o clampeamento total do pedículo hepático.

No Grupo Controle foram observados inúmeros macrófagos em contato com eritrócitos, sendo que alguns deles apresentavam no seu citoplasma alguns grânulos eletrondensos (Fig.3C).

Nos Grupos E₁, E₂ e E₃ notou-se intensa vasodilatação que se acentua com o decorrer do tempo de clampeamento e maior concentração de macrófagos contendo no seu interior inúmeros grânulos eletrondensos (Fig.3 E₁, E₂ e E₃). Em alguns macrófagos notou-se que os grânulos eletrondensos estavam constituídos por restos de hemácias ou de células (Fig.3 E₁, E₂ e E₃).

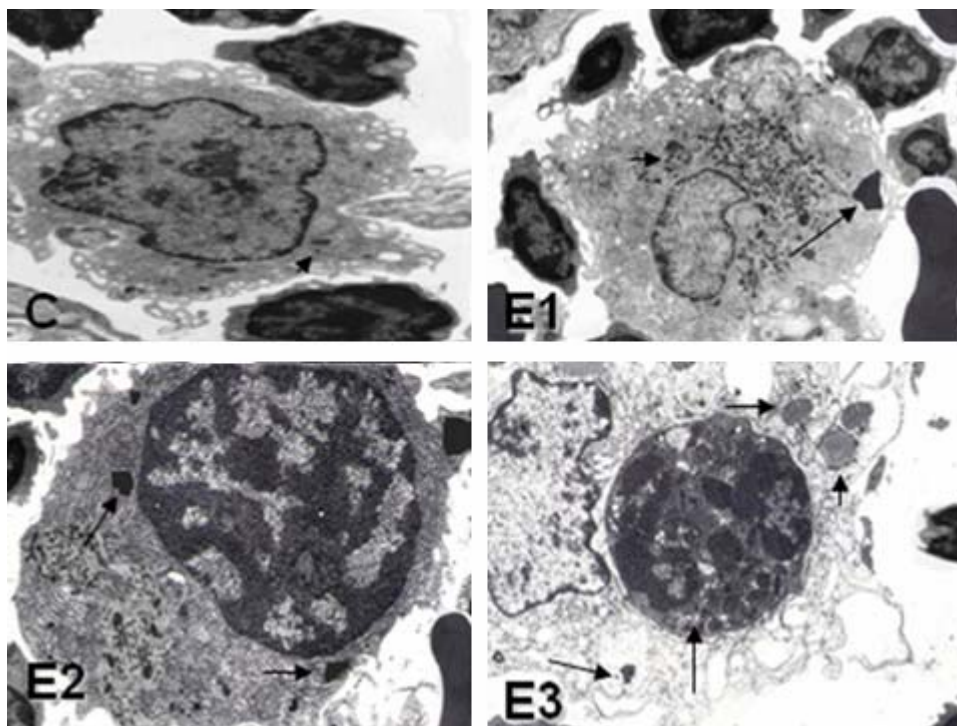


Figura 3. Eletromicrografias mostrando macrófagos presentes nos cordões de Billroth dos ratos pertencentes aos vários grupos (C, E₁, E₂ e E₃). Notar em C (Grupo Controle) poucos grânulos eletrondensos (seta), que aumentam em números (setas) com o decorrer do tempo de clampeamento hepático (E₁, E₂ e E₃). 8200X.

DISCUSSÃO

A torção esplênica primária ou secundária, decorrente da dilatação e vólvulo-gástrico, em pequenos animais, inicialmente promove a oclusão das veias de paredes delgadas, mas não das artérias correspondentes, resultando em congestão, isquemia e, posteriormente, necrose do parênquima esplênico. A patogênese da torção ainda não está bem esclarecida, porém o grau de lesão esplênica irá depender do comprometimento dos vasos e do tempo de privação sanguínea para esse órgão (POPE e ROCHAT, 1996). Da mesma forma, neste estudo, a congestão esplênica observada após clampeamento total do pedículo

hepático, não promoveu necrose, pois a obstrução vascular comprometeu apenas a circulação venosa, mantendo-se intacta a circulação arterial. Provavelmente, o tempo de clampeamento não foi suficiente para causar necrose deste órgão, embora tenha promovido congestão esplâncnica.

Neste experimento foi utilizada a manobra de Pringle (1908) modificada, uma técnica que consiste no clampeamento do pedículo hepático (artéria hepática, veia porta e colédoco). Com essa técnica observou-se congestão esplâncnica, que resultou na congestão esplênica. Barbarino et al. (1978) já haviam utilizado apenas a ligação da veia porta e, observaram, em relação ao baço, esplenomegalia, aumento do diâmetro da polpa vermelha, diminuição do número de folículos de Malpighi, como pôde, também, ser observado neste trabalho. Da mesma forma, Sebe et al. (2000) e Camargo et al. (2003), em seus experimentos, observaram congestão esplâncnica, com mudança de coloração dos órgãos drenados pelo sistema porta.

De acordo com a literatura consultada, os períodos experimentais de tempo de isquemia hepática variam desde 30 minutos até 100 minutos (ASAKAVA et al., 1989; ISOZAKI et al., 1995), sendo os maiores períodos de tempo relacionados com trabalhos que envolvem isquemia hepática parcial ou total com derivações vasculares e os menores períodos de tempo relacionados com trabalhos que envolvem isquemia total, sem derivações vasculares, como descrito por Sébe (1999) e reproduzido neste estudo.

No modelo experimental realizado por Sébe (1999), Freitas et al. (1999; 2000) e Camargo et al. (2003), utilizando a manobra de Pringle modificada por 10, 20 e 30 minutos, notou-se isquemia hepática, intestinal e congestão esplênica, decorrentes da congestão esplâncnica. A isquemia hepática total em diferentes tempos, acarreta congestão esplâncnica e, conseqüentemente, congestão esplênica, que é caracterizada pela diminuição da polpa branca (nódulos linfáticos) e pelo aumento da polpa vermelha, sendo essa mais intensa aos trinta minutos, conforme relatada por Freitas et al. (2006) e confirmada através deste estudo.

A hemocaterese fisiológica de eritrócitos envelhecidos, lesionados ou enfermo, pelos macrófagos, libera grandes concentrações de ferro reutilizável, que é armazenado pelo baço e parte é direcionado à medula óssea para ser utilizado na produção de novas hemácias (POPE e ROCHAT, 1996; ALENCAR et al., 2002).

O clampeamento do hilo hepático pode reduzir a concentração de energia e intensificar a acidose láctica esplênica, que poderá causar danos às membranas dos eritrócitos e alteração de sua elasticidade, aumentando a fagocitose das hemácias danificadas pelos macrófagos, resultando numa maior produção de pigmentos férricos de hemossiderina. Estas alterações ocorrem devido ao fato da concentração de glicose e colesterol nos seios venosos esplênicos

ser menor se comparado ao restante do sistema circulatório, que juntamente com a produção de ácido láctico através do metabolismo das hemácias, resulta num ambiente tolerado apenas por hemácias jovens e saudáveis, levando ao descarte das hemácias velhas ou enfermas (POPE e ROCHAT, 1996).

Também, o aumento da pressão sangüínea e da temperatura esplênica podem lesionar os eritrócitos e intensificar a eritrofagocitose pelos macrófagos (FRASER, 1986; POPE e ROCHAT, 1996; CARLTON e McGAVIN, 1998). Desse forma, notou-se nesse experimento, que durante o clampeamento do pedículo hepático, a drenagem venosa esplênica, realizada pelo sistema porta, ficou comprometida, caracterizada pela congestão esplênica, que possivelmente, acarreta um aumento da pressão sanguínea intraesplênica. O acúmulo progressivo de pigmentos férricos de hemossiderina observado no interior dos macrófagos, caracteriza a eritrofagocitose decorrente do aumento da pressão sanguínea no parênquima e seios venosos esplênicos.

A mensuração e a quantificação dos tecidos podem ser realizadas pela morfometria manual ou digital (HALASZ et al., 1993, VEIAGA et al., 2007). A quantificação morfométrica digital (Softwares IMAGELAB 2000), por ser um método prático e confiável, foi utilizada neste experimento, onde foi possível mensurar em porcentagem os pigmentos férricos de hemossiderina presentes nos macrófagos esplênicos em diferentes tempos.

Os oxirradicais livres (ânions hiperóxidos, radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio) são moléculas altamente reativas e capazes de causar lesões celulares e no DNA. O peróxido de hidrogênio não é um radical livre, porém, com a produção acelerada e em presença de catalizadores metálicos como o ferro, através da reação de Haber-Weiss, formam radicais hidroxila reativos (OH) (FLAHERTY e WEISFELDT, 1988; AMBRÓSIO et al., 2000; ALENCAR, et al., 2002; VALCARENGHI, 2006). Neste experimento, notou-se um aumento considerado de pigmentos férricos de hemossiderina, proporcionalmente ao tempo de clampeamento. Provavelmente, os pigmentos férricos contidos nos macrófagos, após o desclampeamento do hilo hepático possam adentrar a circulação e aumentar a produção de radicais livres, causando lesões às membranas celulares e, dependendo do grau destas lesões, levar a óbito o paciente no pós-operatório.

Conforme nota-se nas literaturas consultadas, é de interesse estudar as possíveis alterações que, eventualmente, possam ocorrer nos órgãos afetados pelo clampeamento do hilo hepático durante procedimentos cirúrgicos realizados no fígado. Baseado nos trabalhos de SEBE et al.(1999) e CAMARGO (2003) que observaram alterações estruturais, por meio de microscopias de luz e eletrônica de transmissão, em nível das vilosidades intestinais e,

também, congestão esplâncnica após clampeamento total do pedículo hepático, foi possível demonstrar, com este estudo, inúmeras alterações esplênicas, que salientam a necessidade de pesquisas complementares nesta área, principalmente no que tange sua proximidade à clínica médica-cirúrgica.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos permitem concluir que 10 minutos de clampeamento total do pedículo hepático são suficientes para apresentar sinais de congestão esplênica e 20 e 30 minutos, promovem diminuição da polpa branca, dilatação dos capilares sinusóides, intensa digestão de hemácias pelos macrófagos, com presença de grânulos de ferro (hemossiderina) no parênquima esplênico.

REFERÊNCIAS

ALENCAR, N. X.; KOHAYAGAWA, A. CAMPOS, K.C.H. Metabolismo do ferro nos animais domésticos: revisão. **Revista de Educação Continuada**. v.5, p.196-205, 2002.

AMBRÓSIO, A.M.; FANTONI, D. T. MIGLIAT, E.R. Síndrome de isquemia e reperfusão em cães: revisão de literatura. **Clinica Veterinária**, n.24, p. 34-8, 2000.

ARAÚJO JÚNIOR, F. A; BRAZ, M. N; ROCHA NETO, O. G.; COSTA, F. D.; BRITO, M. V. H. Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirúrgica Brasileira**v.20 n.1, p.93-99, 2005.

ASAKAVA, H.; JEPPSON, B.; MACK, P.; HULTBERG, B.; HAGERTRAND, I.; BENGMARK, S. Acute ischemic liver failure in the rat: a reproducible model not requiring portal decompression. **European Surgical Research**, v.21, p.42-8, 1989.

BARBARINO, F.; NEUMANN, E.; TAMAS, S.; SUCIU, A.; ANDERCOU, A., ABRUDAN, O, DADEA, B. B. J. Mofologic, Histoenzymatic and radioisotopic changes in the liver after portal veins ligation. **Med Interne**, v. 16, p. 375-81, 1978.

CAMARGO, L. M.; EVÊNCIO NETO, J.; FREITAS, S. H.; SIMÕES, M. J.; GOMES, P. O.; SÉBE, A. A. Aspectos ultra-estruturais das vilosidades intestinais após o clampeamento do pedículo hepático de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.18, n.6, p.509-513, 2003.

CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M. D. **Patologia veterinária especial**. 2ed. Porto Alegre: 1998. p.305, 349.

COUTO, C. G.; HAMMER, A. S. Afecções dos linfonodos e baço. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4ed. São Paulo: Manole. 1997. v.2, p.2684-2696.

FLAHERTY, J. T.; WEISFELDT, M. L. Reperfusion injury. **Free radical byology & medicine**, v.5, p.409-19, 1988.

FRASER, C. M. **Manual merck de veterinária**. 6ed. São Paulo: Roca, 1991. p. 26-27.

FREITAS, S. H. ; EVENCIO NETO, J. ; SANTOS, M. D. ; SIMÕES, M. J. ; CAMARGO, L. M. ; RONDON, A. S. . **Avaliação qualitativa de pigmentos de hemossiderina em parênquima esplênico de ratos após o clampeamento da veia porta hepática**. In: XXXIII CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, Cuiabá - MT., Anais... Cuiabá - MT, 2006, p.26.

FREITAS, S. H., SEBE, A. A., CAMARGO, L. M., SIMOES, M. J. Alterações esplênica em ratos após o clampeamento do pedículo hepático. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 66, (supl), p. 61, 1999.

FREITAS, S. H., SIMOES, M. J., CUBAS, J. J. M., SEBE, A. A., CAMARGO, L. M. Efeito do clampeamento temporário do pedículo hepático sobre a morfologia do baço de ratos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 67, (supl), p. 56, 2000.

GARTNER, L. P., HIATT, J. L. **Tratado de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. p. 228-33.

GEORGE, L. L., ALVES, C. E. R., CASTRO, R. R. L. **Histologia comparada**. 2ed. São Paulo: Roca, 1998. p. 128-32.

HALAZ, I.; AIRD, F.; LI, L.; PRYSTOWSKY, M. B.; REDEI, E. Sexually dimorphic effects of alcohol exposure in utero on neuroendocrine and immune functions in chronic alcohol-exposed adult rats. **Molecular Cellulae Neuroscience**, v.4, p.343-353,1993.

ISOZAKI, H.; OKAJIMA, K; KOBAYASHI, M.; HARA, H.; AKIMOTO, H. – experimental study of liver injury after partial hepatectomy with intermittent or continuous hepatic vascular occlusion. **European Surgical Research**, v.217, p.313-22, 1995.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, p.237-242.

KOLB, E.; GURTLER, H.; KETZ, A; SCHRODER, L.; SEIDEL, H **Fisiologia veterinária**. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1987, p.232, 238, 286, 471.

LIPOWITZ, A. J.; BLUE, I. Baço. In: SLATTER, D. **Manual de cirurgia de pequenos animais**. 2ed. São Paulo: Manole. 1998, v.1, p.1143-1153.

POPE, E. R; ROCHAT, M. C. Baço. In: BOJRAB, M. J. **Mecanismo da molestia na cirurgia dos pequenos animais**. 2ed. São Paulo: Manole. 1996. p.722-728.

PRINGLE, J. H. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. **Annals of Surgery**, v.48, p.541-49, 1908.

RICHARD, S. J.; SHERIND, R. G. **Clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca. 1998. p.206-207.

SÉBE, A. A. **Efeitos de diferentes tempos de isquemia no fígado de ratos**. São Paulo: Universidade de São Paulo: Escola Paulista de Medicina. 1999. 90p. (Tese de Doutorado).

SÉBE, A. A., NIGRO, A. J. T., SIMOES, M. J., GOMES, P. O. Alterações nos intestinos de ratos após clampeamento do pedículo hepático, **Arquivos do Instituto Biológico**, v.66 (supl), p.61, 1999.

SEBE, A. A.; NIGRO, A. J. T.; GOMES, P. O. SIMÕES, M. J. Efeito do clampeamento do pedículo hepático nos intestinos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.15; n.1, p. 2000.

SILVA JR., O. C; CENTURION, S.; EDUARDO G. PACHECO, E. G; BRI SOTTI, J. L.; OLIVEIRA, A. F.; DAL SASSO, K. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 17, suplemento 3, p. 96-100, 2002.

SWENSON, M. J.; REECE, W.O. **Dukes fisiologia veterinária**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1996. p.35.

VALCARENGHI, D. **Avaliação toxicológica crônica do polímero quitosana ferro (III) solúvel**. Santa Catarina: Universidade do Vale do Itajaí. 2006. 87p. (Dissertação de Mestrado).

VEIGA, R. K. A.; MELO-JUNIOR, M. R.; ARAUJO-FILHO, J. L.; MELLO, L. A.; PONTES-FILHO, N. T. Alterações morfométricas no timo, baço e placas de peyer durante a exposição pré e pós-natal ao álcool. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.IV, n.1, p.32-42, 2007.

ZHANG, SHU-xin. **Atlas de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p. 152-57