

SILVIO HENRIQUE DE FREITAS

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ESPLÊNICAS EM
RATOS APÓS O CLAMPEAMENTO TOTAL DO
PEDÍCULO HEPÁTICO**

RECIFE – PE

2003

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

**ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ESPLÊNICAS EM RATOS
APÓS O CLAMPEAMENTO TOTAL DO PEDÍCULO
HEPÁTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Mestrando: Silvio Henrique de Freitas

Orientador: Prof. Dr. Joaquim Evêncio Neto

RECIFE - PE

2003

ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS ESPLÊNICAS EM RATOS APÓS O
CLAMPEAMENTO TOTAL DO PEDÍCULO HEPÁTICO

**Dissertação de Mestrado elaborada por
SILVIO HENRIQUE DE FREITAS**

Aprovado pela Banca Examinadora

Prof. Dr. Joaquim Evencio Neto

Prof. Dra. Liriane Baratella Evêncio

Prof. Dra. Maria Cristina de Oliveira
Cardoso Coelho

Prof. Dr. Fabrício Bezerra de Sá

Recife, Julho de 2003

DEDICATÓRIA

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

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e amigos que sempre estiveram presentes ao meu lado apoiando e torcendo pelo sucesso desse trabalho;

Ao ORIENTADOR E PROFESSOR DOUTOR JOAQUIM EVÊNIO 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 mestrado;

Ao PROFESSOR DOUTOR ROBERTO SOARES DE CASTRO, Professor Adjunto da Disciplina de Virose dos Animais Domésticos do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, pela atenção e dedicação voltada para educação. Obrigado pela colaboração, confiança e apoio durante o desenvolvimento desse trabalho;

Ao PROFESSOR DOUTOR 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 educação. Obrigado pela colaboração, confiança e apoio, não só durante o mestrado, mas por todo tempo que estivemos juntos trabalhando.

Ao PROFESSOR DOUTOR ABRÃO ANTONIO SÉBE, Professor adjunto de Medicina e Pró-Reitor Administrativo da Universidade de Cuiabá – UNIC, pelo apoio e incentivo durante o desenvolvimento desse trabalho, com o qual vi e senti o meu crescimento pessoal e profissional;

Ao PROFESSOR DOUTOR MARCOS ANTONIO LEMOS DE OLIVEIRA, Professor Adjunto da Reprodução Animal da disciplina de Medicina Veterinária da Universidade federal rural de Pernambuco-UFRPE, pelo apoio e pela confiança depositada em mim. Obrigado por essa oportunidade.

Ao PROFESSOR LÁZARO MANOEL DE CAMARGO, Diretor do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Cuiabá - UNIC, pelo companheirismo, pela confiança depositada em meu trabalho e principalmente pela ajuda oferecida em todo meu trabalho. Obrigado pela credibilidade;

Aos Funcionários: MAX MAGNO FERREIRA MENDES, RONALDO e WILIAM DE FRANÇA CARNEIRO LEÃO, pela dedicação, disposição e empenho que demonstraram durante o desenvolvimento do trabalho;

Ao PROFESSOR DOUTOR CLAUDEMIR BATALINI, Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade de Cuiabá UNIC, pelo incentivo, apoio e por ter confiado neste trabalho. Obrigado pelo direcionamento, pelas dicas, pela paciência e principalmente por ter norteado-me;

À BIÓLOGA E PROFESSORA GEORGETE CARNIBE, pelo incentivo e apoio para que pudesse continuar este trabalho até o fim;

À MÉDICA VETERINÁRIA NAIÁ GIRARDI, pelo apoio, força e incentivo durante todo mestrado;

Ao PROFESSOR DOUTOR DELCIONE SILVEIRA, pelo direcionamento nesse trabalho e por ter mostrado o caminho difícil da pesquisa, obrigado;

À Funcionária do Hospital Veterinário da faculdade de Medicina Veterinária UNIC, REGINA HELENA DIAS CAMPOS, pela ajuda que nos foi dada e principalmente pelo seu conhecimento em informática. Obrigado pelas sugestões e dicas;

À secretária EDNA SHÉRIAS do Programa de Pós-Graduação em Ciência Veterinária pelo apoio e dedicação voltada aos alunos, funcionários e principalmente aos professores dessa instituição;

Aos professores e colegas do Curso de Pós-graduação pelo agradável convívio e amizade;

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização desse trabalho.

RESUMO

Modelos experimentais de isquemia hepática têm sido muito difundidos. A manobra de Pringle, ou seja, o clampeamento por pinça vascular da artéria, veia e ducto hepático e da veia porta, é utilizado em muitos desses modelos. Esses modelos são utilizados para estudos em transplantes hepáticos. Uma das complicações dessa manobra é a congestão esplâncnica. Este trabalho tem como objetivo observar as alterações que ocorrem no baço frente a isquemia produzida pelo clampeamento do pedículo hepático. Para tanto foram utilizados 36 ratos machos, divididos em quatro grupos de 9 animais cada. O grupo Sham (S) não foi submetido a isquemia, já os grupos E₁, E₂ e E₃ foram submetidos a manobra de Pringle por 10, 20 e 30 minutos respectivamente. Após esses períodos, fragmentos do baço foram retirados, fixados em formaldeído e processados para inclusão em parafina. Os cortes foram corados pela Hematoxilina e Eosina e pelo Ferrocianeto-Férrico. Nossos resultados mostraram alterações microscópicas nos grupos E₂ e E₃, onde notou-se intensa congestão vascular, grânulos de hemossiderina, diminuição da polpa branca (nódulos linfáticos e bainha periarteriais) e intensa hemocaterese ao redor dos sinusóides esplênicos, sendo essas alterações mais intensa aos 30 minutos. Neste grupo ocorreu uma acentuada digestão de hemácias com presença de grânulos de hemossiderina. Os dados obtidos permitiram concluir que aos 20 minutos já começa haver sinais de congestão esplênica, e que aos 30 minutos diminuição do seu parênquima esplênico e aumento da concentração de pigmentos de ferro.

ABSTRACT

Experimental models of hepatic ischemia have been very widespread. The Pringle maneuver, i.e. clamping by vascular tongs of the artery, vein and hepatic duct, and of the portal vein is used in many of these models. These models are used for studies in liver transplants. One of the complications in this maneuver is the splanchnic congestion. This study has as objective the observation of the changes that occur in the spleen due to the ischemia produced by the clamping of the hepatic peduncle. For this 36 male mice were divided into four groups with 9 animals each. The Sham (S) group was not submitted to ischemia, and the groups E1, E2 and E3 were submitted to the Pringle maneuver for 10, 20 and 30 minutes, respectively. After these periods, fragments of the spleen were taken, fixed in formaldehyde and processed for inclusion in paraffin. The slits were dyed with Haematoxylin and Eosin and with Ferric-ferrocyanide. The results showed microscopic alterations in groups E2 and E3. There was intense vascular congestion, hemosiderin granules, decrease in the white pulp (lymphatic nodules and periarterial sheaths) and intense hemocateresis around the splenic sine curves, being these changes more intense at 30 minutes. In this group there was an accentuated digestion of red blood cells with the presence of hemosiderin granules. The data obtained permit us to conclude that at 20 minutes signs of spleen congestion begin and that at 30 minutes there is decrease in splenic parenchyma and increase in concentrations of ferric pigments.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aplicação de anestésico pela via intramuscular na região posterior da coxa.....	20
Figura 2	Animal sendo submetido a tosquia com uma máquina tosquiadeira para animais.....	21
Figura 3	Anti-sepsia da região abdominal com PVPI.....	22
Figura 4	Campos operatório colocado sobre o animal e fixos com pinças Backhaus.....	22
Figura 5	Incisão mediana pré-umbilical no animal com um bisturi.....	23
Figura 6	Ampliação da incisão da cavidade abdominal com uma tesoura Metzenbaum.....	24
Figura 7	Apresentação do hilo hepático (sistema porta).....	24
Figura 8	Clampeamento do hilo hepático com uma pinça vascular.....	25
Figura 9	Coleta do baço após o clampeamento utilizando uma tesoura Metzenbaum.....	26
Figura 10	Fotomicrografia de baço de rato pertencente ao grupo sham. Coloração: Hematolixina-eosina. Aumento: 180X.....	30
Figura 11	Fotomicrografia de baço de rato pertencente ao grupo sham. Coloração: Ferrocianeto-férrico. Aumento: 180X).....	30

Figura 12	Fotomicrografia de baço de rato pertencente ao grupo E ₁ . Coloração: Hematolixina-eosina. Aumento: 180X.....	31
Figura 13	Fotomicrografia de baço de rato pertencente ao grupo E ₁ . Coloração: Ferrocianeto-férrico. Aumento: 180X).....	31
Figura 14	Fotomicrografia de baço de rato pertencente ao grupo E ₂ . Coloração: Hematolixina-eosina. Aumento: 180X.....	32
Figura 15	Fotomicrografia de baço de rato pertencente ao grupo E ₂ . Coloração: Ferrocianeto-férrico. Aumento: 180X.....	32
Figura 16	Fotomicrografia de baço de rato pertencente ao grupo E ₃ . Coloração: Hematolixina-eosina. Aumento: 180X.....	33
Figura 17	Fotomicrografia de baço de rato pertencente ao grupo E ₃ . Coloração: Ferrocianeto-férrico. Aumento: 180X.....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Ratos submetidos a diferentes períodos de clampeamento do hilo hepático, segundo o peso do baço.....	28
Tabela 2	Ratos submetidos a vários períodos de clampeamento do pedículo hepático, segundo a presença de pigmentos hemossiderina.....	34

LISTA DE ABREVIATURAS

UNIC – Universidade De Cuiabá

UNIFESP – EPM – Universidade Federal de São Paulo –Escola Paulista de Medicina

Grupo S – Grupo Sham (Simulado)

Grupo E₁ – Grupo experimento 1

Grupo E₂ – Grupo experimento 2

Grupo E₃ – Grupo experimento 3

PVPI – polivinilpirrolidona a 10%

cm – centímetro

mm – milímetro

HE – Hematoxilina-eosina

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. METODOLOGIA.....	19
3.1 Amostra.....	19
3.2 Procedimento.....	20
3.3 Análise estatística.....	27
4. RESULTADOS	28
4.1 Macroscópicos.....	28
4.2 Microscópicos.....	29
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÕES	39
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

1. INTRODUÇÃO

O baço é o maior órgão linfóide do organismo, que está localizado entre a curvatura maior do estômago, peritônio parietal da parede abdominal lateral esquerda e o fígado (EVANS & LAHUNTA, 1994; GARTNER & HIATT, 1999). É constituído por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroelástico, de onde partem trabéculas que servem para conduzir os vasos sanguíneos e nervos (GEORGE et al., 1998), sendo mais espessa na região próxima ao hilo (GARTNER & HIATT, 1999).

As trabéculas originárias da cápsula transportam vasos sanguíneos para dentro e para fora do parênquima esplênico. 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 & WEISS, 1981; DELLMANN & BROWN, 1982; BIER et al., 1989; STITES et al., 1997, GARTNER & HIATT, 1999). Ao corte, a superfície do baço possui áreas acinzentadas envolvidas por áreas avermelhadas, denominadas respectivamente de polpa branca e polpa vermelha (GARTNER & HIATT, 1999).

O baço é irrigado pela artéria esplênica que se ramifica 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 & HIATT, 1999). Estes vasos esplênicos, ao atingirem diâmetros de 0,2mm, abandonam as trabéculas e vão sendo envolvidos por uma bainha de linfócitos denominado de bainha linfática periarterial. Por estar localizado no centro da bainha, o vaso sanguíneo passa a ser chamado de artéria central (KOLB et al., 1987; BURKITT, 1994; GARTNER & 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 na polpa vermelha. Estas arteríolas possuem três regiões denominadas de arteríola pulpar, arteríola encapsulada e capilares arteriais terminais (GUYTON, 1992; BURKITT et al., 1994; GARTNER & 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 uma combinação das duas. Na primeira, o endotélio dos capilares arteriais terminais tem uma continuidade com o endotélio dos sinusóides. Na segunda, acreditam que o endotélio dos capilares arterial 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 (GARTNER & HIATT, 1999).

O sangue dos sinusóides esplênicos é drenado por pequenas veias da polpa que vão aumentando de calibre até formar a veia esplênica que é uma tributária da veia porta hepática (GARTNER & HIATT, 1999).

A polpa branca é formada por uma massa linfóide esplênica constituída por linfócitos T e B, que corresponde aproximadamente 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 & HIATT, 1999). Os linfócitos T estão localizados ao redor da arteríola central, enquanto os linfócitos B constituem os nódulos linfáticos, que podem apresentar centros germinativos com atividade antigênica (GEORGE et al., 1998; GARTNER & 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 & HIATT, 1999)

A polpa vermelha representa a maior parte do baço. Ela é constituída de sinusóides sangüíneos e cordões esplênicos (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 & ROCHAT, 1996; GARTNER & HIATT, 1999). É bastante semelhante a uma esponja, onde as lacunas representam os sinusóides e as estruturas que interligam essas lacunas representa os cordões esplênicos (GARTNER & HIATT, 1999). Os sinusóides esplênicos possuem um endotélio revestido por células fusiformes. Estas células estão envolvidas por fibras reticulares que se enrolam ao redor como um filme e possuem uma lâmina basal descontínua. 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, serão fagocitadas e destruídas pelos macrófagos esplênico (hemocaterese) (GEORGE et al., 1998; GARTNER & HIATT, 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 e as moléculas de ferro, 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 & REECE, 1996; COUTO & HAMMER, 1997; CARLTON & MCGAVIN, 1998; GEORGE et al., 1998; GARTNER & HIATT, 1999).

Nos animais, menos o homem, o baço tem uma grande importância como reservatório sangüíneo, podendo, quando solicitado e sobre ação das catecolaminas elevar o hematócrito até 10% do seu valor normal (KOLB et al., 1987; LIPOWITZ e BLUE, 1998). Além da elaboração de anticorpos e produção em baixa escala de linfócitos T e B. (LIPOWITZ & BLUE, 1998; RICHARD & SHERIND, 1998; LIPOWITZ & BLUE, 1998), o baço ainda possui função hematopoiética nos recém nascidos, e quando necessário pode vir a desenvolver-se nos adultos (LIPOWITZ & BLUE, 1998).

Na congestão esplâncica o baço é um dos órgãos acometido, pois a pressão sangüínea nele se eleva e aumenta o seu poder eritrofagocitário com grande destruição de eritrócitos (CARLTON & MCGAVIN, 1998; FRASER, 1991).

Durante o clampeamento total do pedículo hepático, haverá uma congestão esplâncica e perfusão sanguínea deficiente de órgãos como estômago, intestino delgado e parte anterior do intestino grosso, baço e pâncreas. Esse procedimento resulta em hipóxia celular, 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 & GUILFORD, 1995).

O oxigênio é utilizado nas células para oxidar substratos energéticos por meio de enzimas citocromo oxidase. Nessa reação o oxigênio recebe quatro elétrons e é reduzido em água. A redução por um elétron resulta na formação do radical superóxido (O_2^-), a redução por dois elétrons resulta no peróxido de hidrogênio (H_2O_2), a redução por três elétrons resulta no radical

hidroxil (.OH) e a redução por quatro elétrons forma a água (FLAHERTY & WEISFELDT, 1988).

A 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. O peróxido de hidrogênio é considerado menos potente. Contudo, na presença de íons de metais como o ferro, o peróxido de hidrogênio pode ser convertido em radicais hidroxil (FLAHERTY & WEISFELDT, 1988).

Nas lesões sangrantes do fígado, Pringle em 1908 utilizou o clampeamento total do hilo hepático para conter hemorragias. Para melhorar as 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 uma esplenomegalia, com aumento da polpa vermelha, diminuição do número de folículos de Malpighi, que se apresentaram aumentados de tamanho.

Sébe, em 1999a, observou em ratos que o clampeamento total do hilo hepático por mais de vinte minutos leva a lesões nas organelas dos hepatócitos e também congestão esplâncnica. A partir deste fato propôs-se este trabalho, com o objetivo de avaliar alterações macro e microscópicas do baço durante o clampeamento total do pedículo hepático (manobra de Pringle) nas correções cirúrgicas do fígado.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar as alterações esplênicas em baços de ratos após o clampeamento do pedículo hepático.

2.2 Específicos

Avaliar a macro e microscopicamente a morfologia dos baços de ratos após o clampeamento total do pedículo hepático.

3. METODOLOGIA

3.1 Amostra

Foram utilizados 36 ratos (*Rattus norvegicus albins*), Wistar, machos, de três meses de idade e pesando 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. A temperatura foi mantida por ar condicionado a 22°C e a higienização das gaiolas era feita diariamente. Manteve-se a umidade em 65% e a luminosidade foi controlada artificialmente com 12 horas de luz e 12 horas sem luz.

Utilizou-se ração Labina (Purira) própria para ratos, e manteve-se os animais em jejum alimentar no período de duas horas anterior à cirurgia.

Os animais foram divididos em quatro grupos de 9 animais, denominados Grupo S (*Sham*) e grupos E₁, E₂, E₃ (Experimento). Em cada grupo seguiu-se os seguintes procedimentos:

Grupo S – 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.

3.2 Procedimento

Os ratos foram trazidos até o Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental da UNIC instantes antes do início do experimento.

Os animais após serem sorteados aleatoriamente foram enquadrados em um dos grupos.

Cada animal foi sorteado e etiquetado com um número de 1 a 9 e acrescida da letra de um dos quatro grupos.

Após o sorteio e identificação, os animais foram submetidos a anestesia dissociativa com 25 mg/kg de xilazina² e 50 mg/kg de quetamina³. A via de administração foi a intramuscular na região posterior da coxa, entre os músculos semitendinoso e o músculo semimembranoso (fig. 01).



Figura 01 - Aplicação da associação anestésica pela via intramuscular na região posterior da coxa.

Em seguida foram realizadas a tosquia da região abdominal dos animais com máquina tosquiadeira (fig. 02).



Figura 02 - Animal sendo submetido a tosquia da região abdominal com máquina tosquiadeira para animais

Os animais foram, mesa cirúrgica, mantidos em decúbito dorsal. A anti-sepsia foi realizada com iodo polivinilpirrolidona a 10% (PVPI – 10% - iodo ativo) (fig. 03). Em seguida foram colocados campos operatórios (fig. 04).

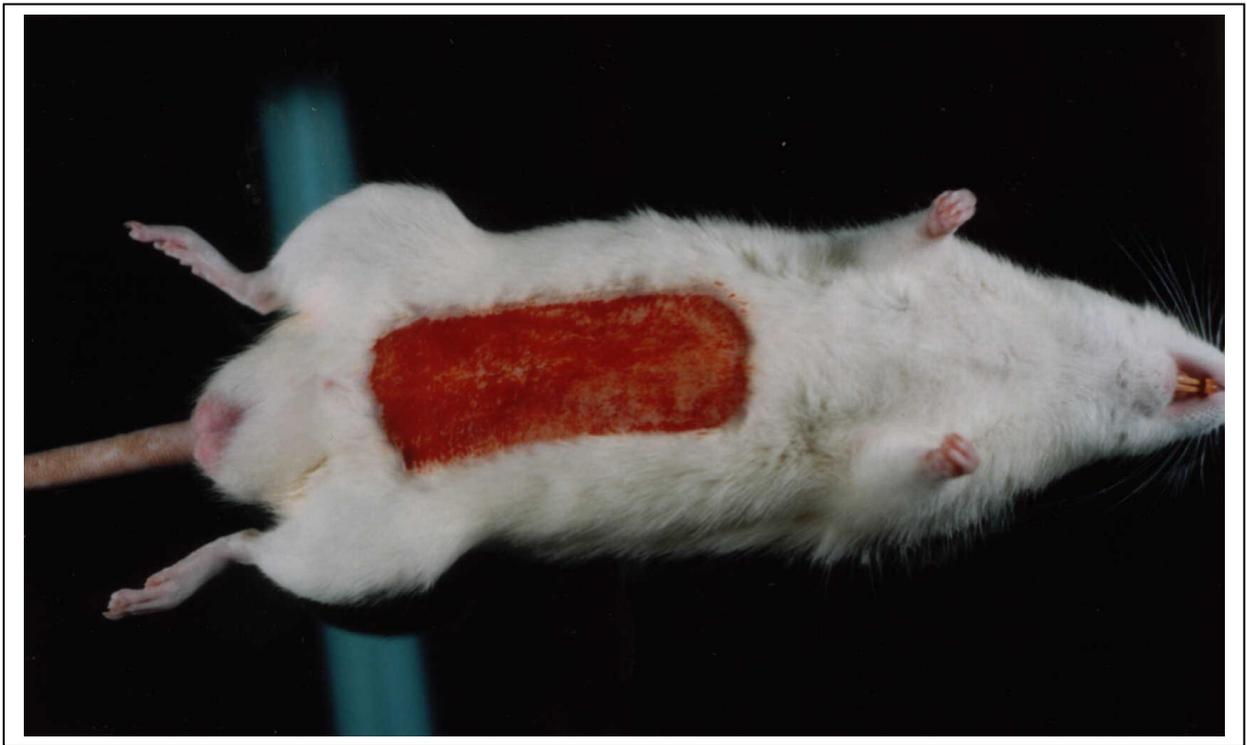


Figura 03 – Anti-sepsia da região abdominal do animal com PVPI.



Figura 04 - Campos operatório colocado sobre o animal e fixos com pinças Backhaus

Foi efetuada uma incisão mediana pré-retro umbilical com lâmina de bisturi nº 11, partindo da cartilagem xifóide por aproximadamente 4 cm caudalmente à cicatriz umbilical. (fig. 05). Procedeu-se a abertura da parede abdominal plano a plano com hemostasia cuidadosa e complementada com tesoura Metzenbaum (fig. 06). Após a abertura da cavidade abdominal identificou-se o hilo hepático.(fig. 07).

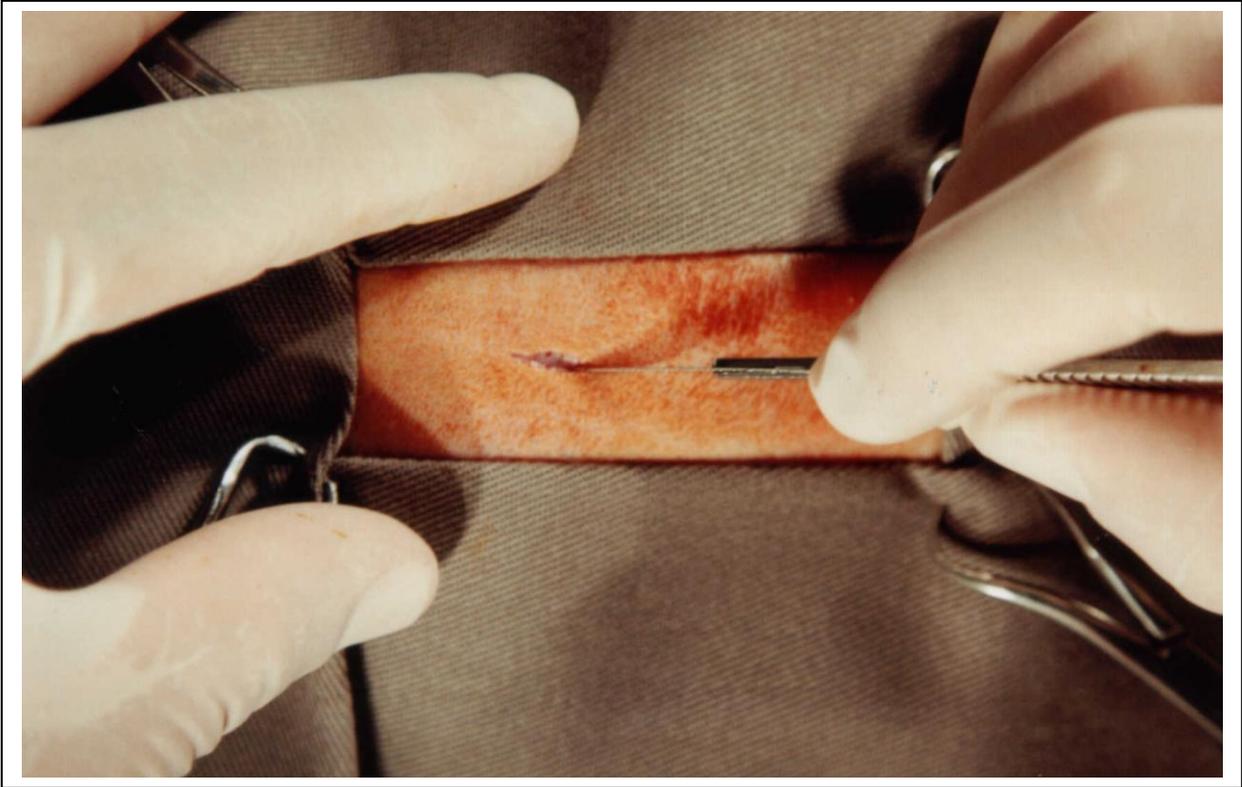


Figura 05 - Incisão mediana pré-retro umbilical do animal com bisturi.

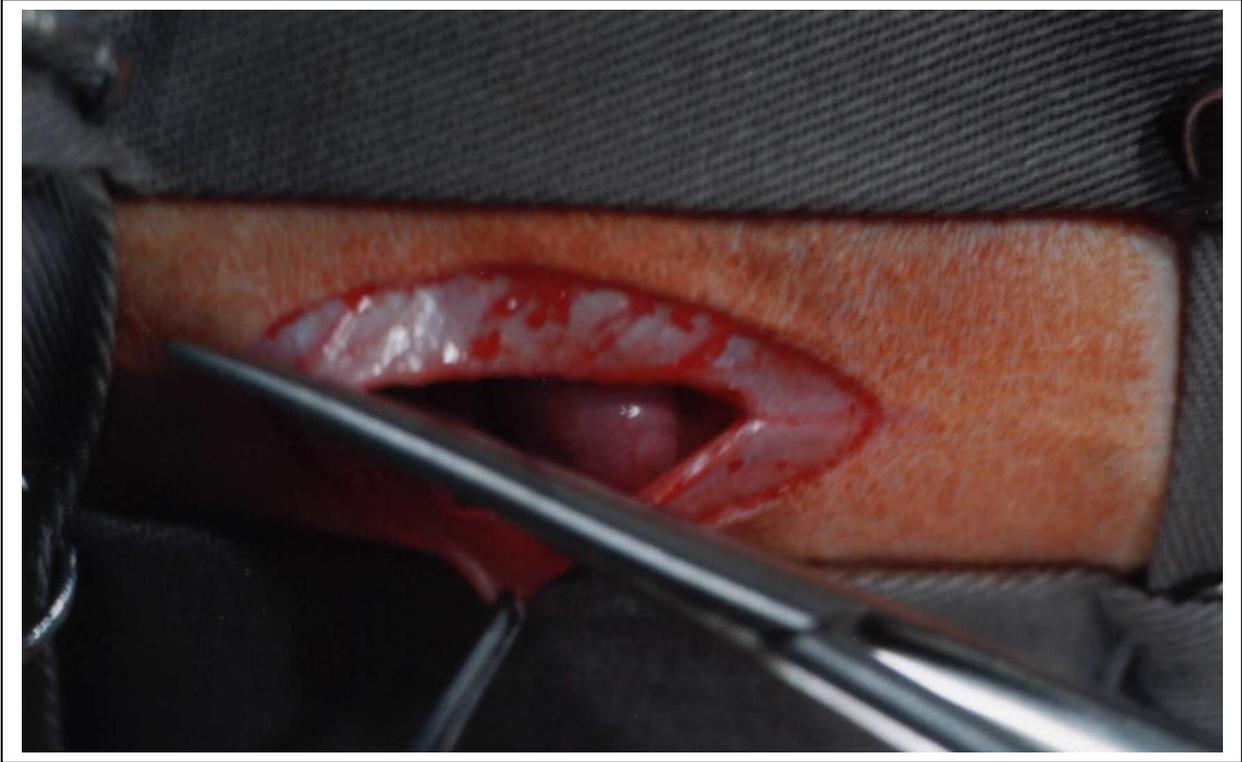


Figura 06 - Ampliação da incisão da cavidade abdominal com uma tesoura Metzenbaum.

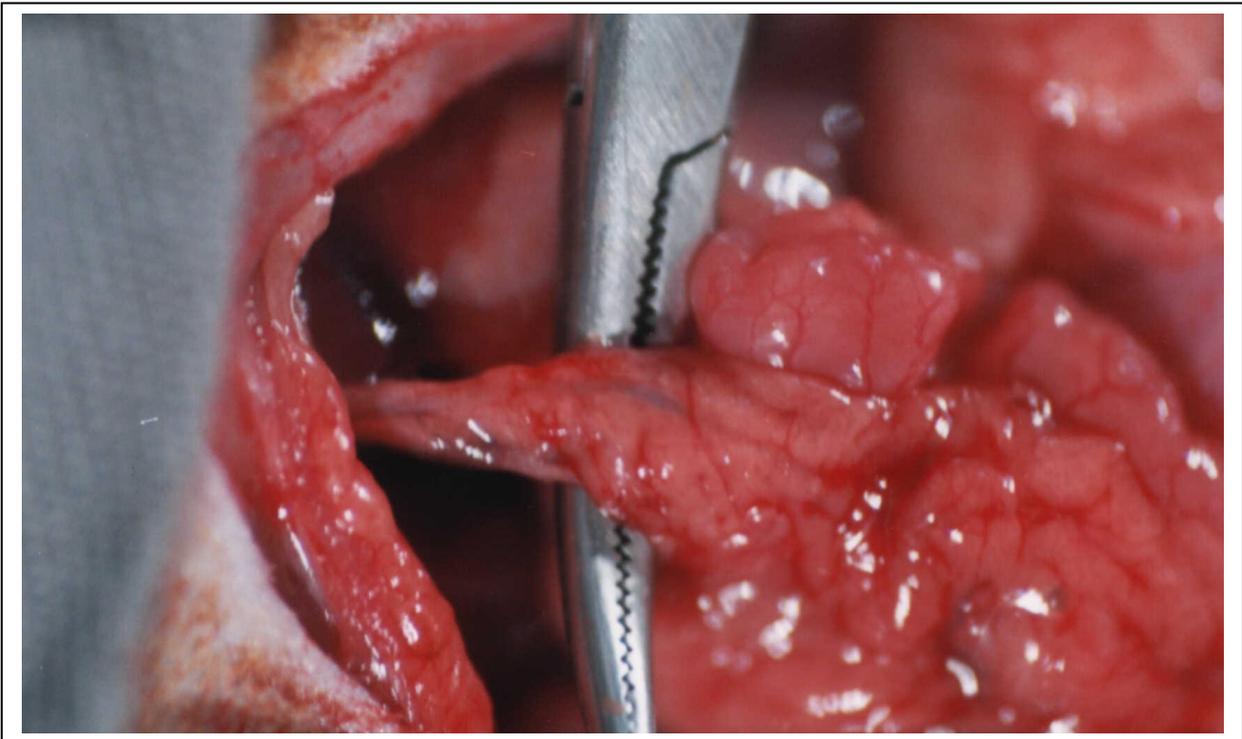


Figura 07 - Apresentação do hilo hepático (sistema porta hepático).

A artéria hepática, a veia porta e o ducto hepático foram clampeados utilizando-se uma pinça de clampeamento vascular de 3 cm (fig. 08).

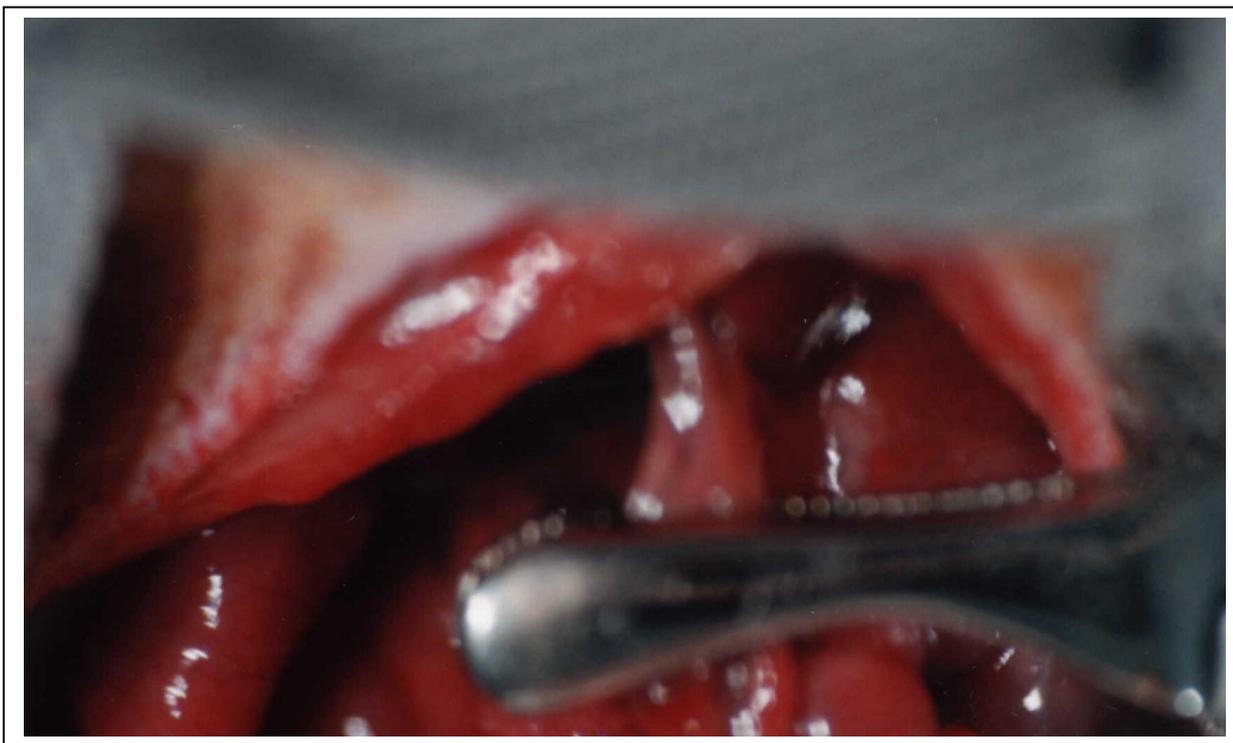


Figura 08 - Clampeamento do hilo hepático com uma pinça vascular

Após o clampeamento, as incisões foram cobertas com gazes embebidas com solução fisiológica aquecida a 0,9%⁵ para evitar a hipotermia e desidratação.

Os animais foram sorteados e de acordo com o seu grupo tiveram seus hilos hepáticos clampeados por 10, 20 ou 30 minutos. Após cada tempo estipulado, o baço foi coletado, utilizando-se uma tesoura Metzenbaum. Foram seccionados todos os componentes do pedículo esplênico (fig. 09).

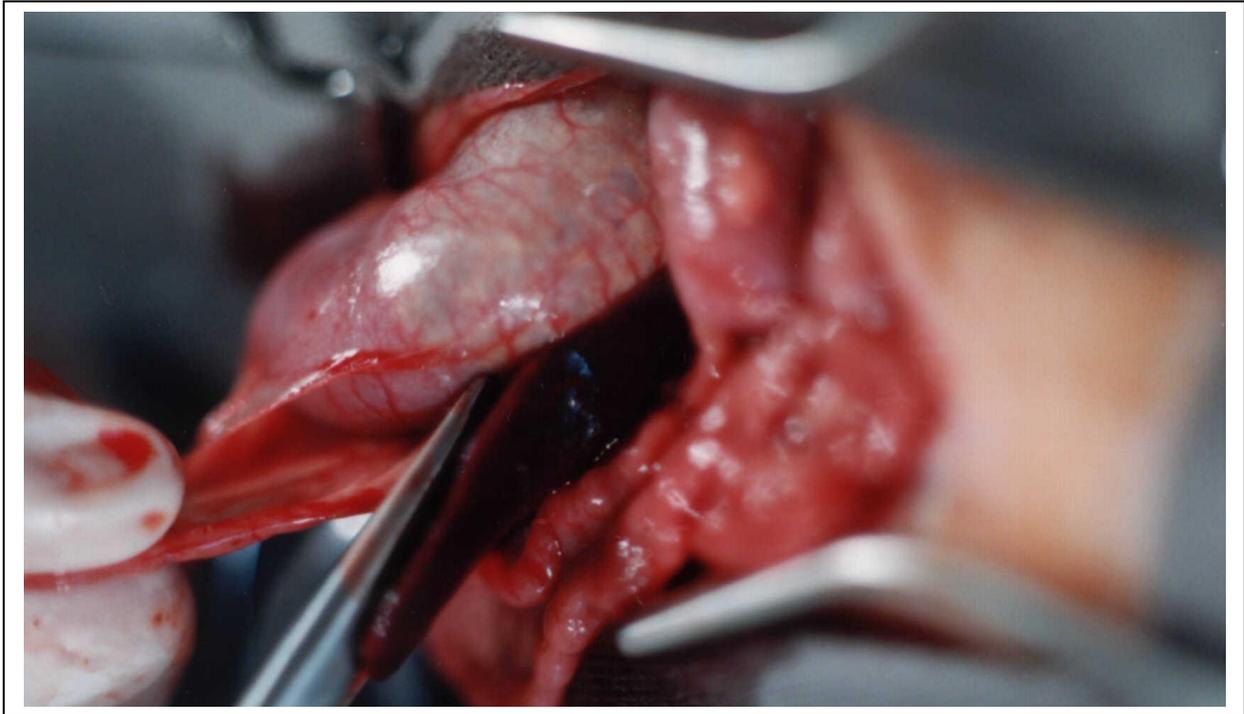


Figura 09 - Coleta do baço após o clampeamento utilizando uma tesoura Metzenbaum

Os animais do grupo S (*Sham*) foram anestesiados, porém não tiveram o hilo hepático clampeado. Após 30 minutos tiveram seus baços coletados.

Após cada tempo estipulado, todos os baços foram removidos e pesados. Em seguida foram coletados fragmentos para análise histopatológica e os animais submetidos a eutanásia.

O baço removido foi analisado quanto a coloração e quanto ao peso. Após ser retirado e pesado, foram coletados fragmentos e imediatamente mergulhado 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 7 μ m de espessura em micrótomo rotativo. Foram corados com hematoxilina-eosina (H.E) e Ferrocianeto-férrico, e analisados em microscopia de luz e fotografados com fotomicroscópio Olympus.

Os achados microscópicos foram descritos e anotados, de acordo com cada tempo de clampeamento.

Os resultados referentes aos pigmentos de hemossiderina foram registrados em cruces e classificados de acordo com o aumento da intensidade em: normal (+), discreta (++) , moderada (+++) e acentuado (++++), pela técnica do Ferrocianeto-férrico.

3.3 Análise estatística.

Para análise dos resultados, foram aplicados os seguintes testes paramétricos e não paramétricos segundo a natureza das variáveis estudadas. Análise de variância (SOKAL & ROHLF, 1969) para confrontar os grupos Controle, E₁, E₂ e E₃ em relação ao peso do baço.

Fixou-se em 0,05 ou 5% ($\alpha < 0,05$) o nível de rejeição da hipótese de nulidade assinalando com um asterisco os valores significantes.

4. RESULTADOS

4.1 Macroscópicos

Na tab. 01 estão expressos os pesos dos baços dos animais utilizados no experimento. Ao final das mesmas encontram-se os resultados das respectivas análises estatísticas.

Após o período de clampeamento do hilo hepático observou-se que os baços de todos os grupos estudados mostraram cor vermelha escuro.

Tabela 01 – Ratos submetidos a diferentes períodos de clampeamento do hilo hepático, segundo o peso do baço (g).

GRUPOS				
	Sham	E₁	E₂	E₃
	1,11	1,13	0,98	0,95
	1,13	1,07	1,09	1,11
	0,96	0,97	1,03	0,99
	1,00	1,12	0,98	0,96
	0,98	0,98	1,20	1,15
	1,01	1,02	0,96	1,01
	1,03	0,99	0,95	0,98
	1,04	0,96	1,11	1,12
	0,97	1,02	1,13	1,14
Média	1.02	1.03	1.05	1.04
Desvio padrão	0.06	0.06	0.09	0.08

Análise de variância
F calculado = 0,2081 (NS)

4.2 Microscópicos

Pela Hematoxilina-eosina e pelo Ferrocianeto-férrico.

Grupo Sham (controle): neste grupo observou-se o 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 podem formar cordões ao redor de vasos sanguíneos ou nódulos com arteríola central. Entre a polpa branca notou-se inúmeros capilares dilatados contendo hemácias no seu interior, polpa vermelha e pequena quantidade de grânulos alaranjados (fig. 10) e também observa-se pequena (normal) quantidade pigmentos férricos de coloração azulada, hemossiderina (fig. 11) (tab. 02).

Grupo E₁ (10 minutos de clampeamento): a arquitetura do baço neste grupo é muito semelhante ao do grupo sham. Entretanto observou-se ligeira vasodilatação nos capilares presentes na polpa vermelha e maior quantidade de grânulos alaranjados que o grupo sham (fig. 12). Observa-se concentração discreta de grânulos de hemossiderina (fig. 13) (tab. 02).

Grupo E₂ (20 minutos de clampeamento): Notou-se que o baço neste grupo apresenta a mesma arquitetura histológica daquela observada no grupo sham. No entanto percebeu-se nítida diminuição da polpa branca, tanto da porção cordonal quanto da nodular. A polpa vermelha mostra-se bem evidente com intensa dilatação dos capilares sinusóides (fig. 14). Observa-se concentração moderada de grânulos de hemossiderina (fig. 15) (tab. 02).

Grupo E₃ (30 minutos de clampeamento): Neste grupo observou-se diminuição da polpa branca com acentuado aumento da polpa vermelha. A polpa branca está praticamente tomada pela polpa vermelha devido a acentuada dilatação dos vasos sanguíneos presentes nesta região (fig. 16). Observa-se concentração acentuada de grânulos de hemossiderina (fig. 17) (tab. 02).

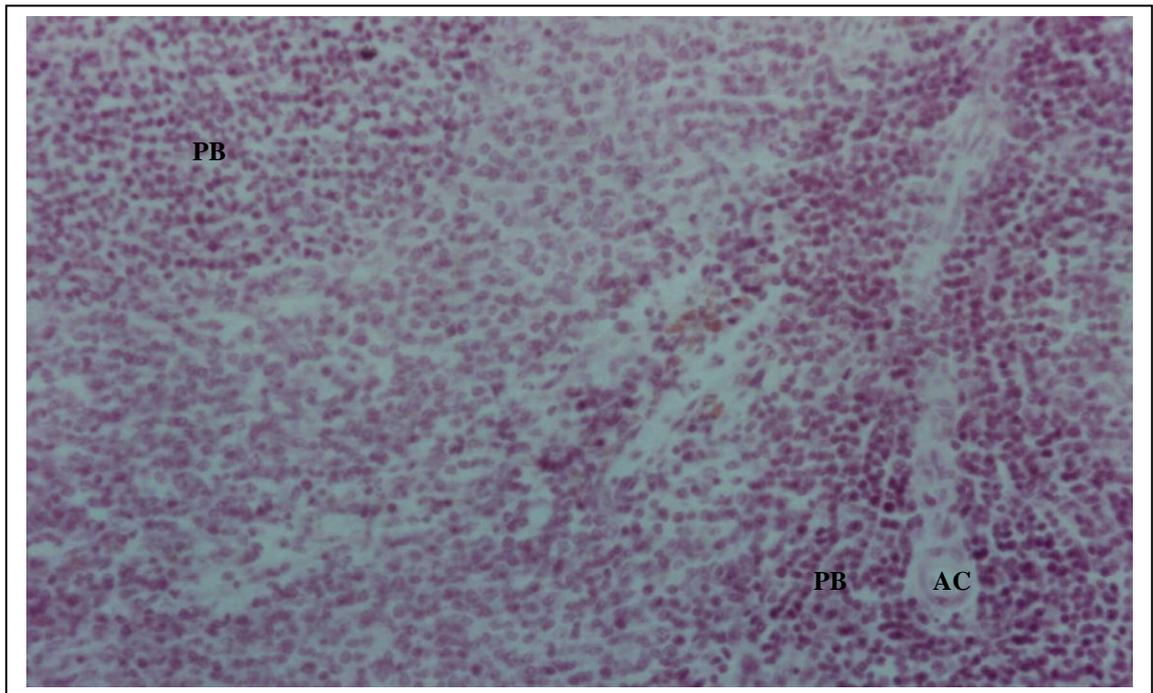


Figura 10 – Fotomicrografia de baço de rato pertencente ao grupo sham. Observar polpa vermelha (PV), polpa branca (PB) e arteríola central (AC). Coloração: Hematolixina-eosina. Aumento: 180X.

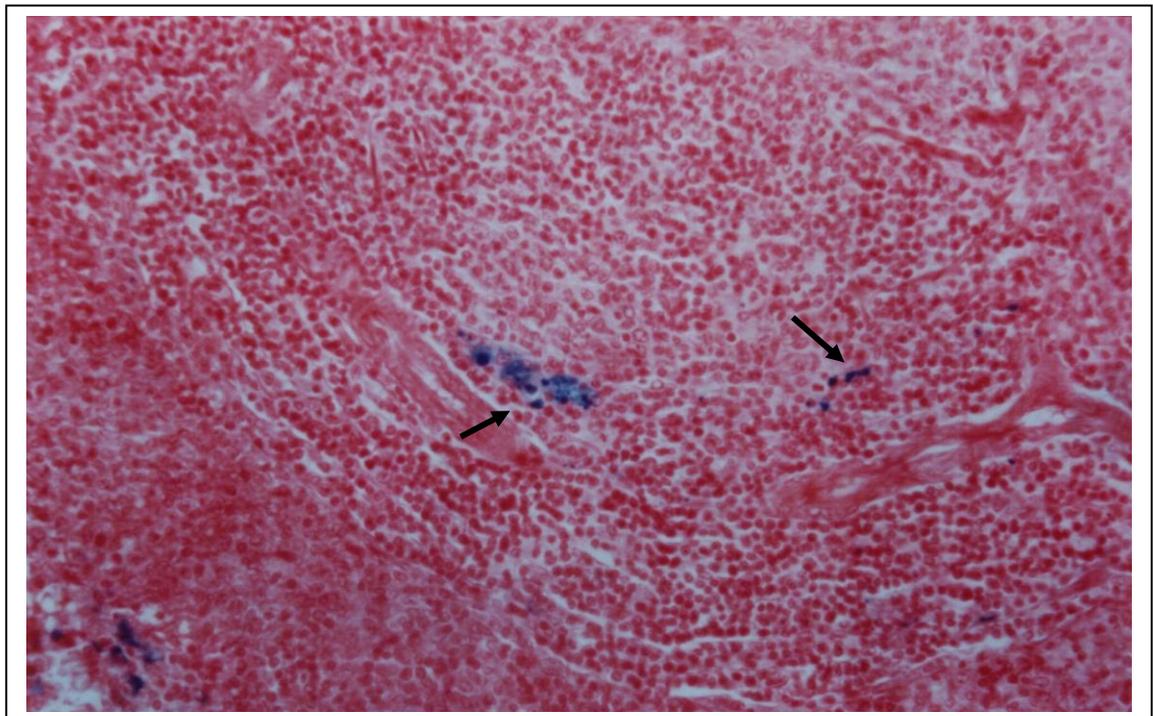


Figura 11 - Fotomicrografia de baço de rato pertencente ao grupo sham. Observar grânulos azulados de hemossiderina no parênquima esplênico (setas). Coloração: Ferrocianeto-férrico. Aumento: 180X.

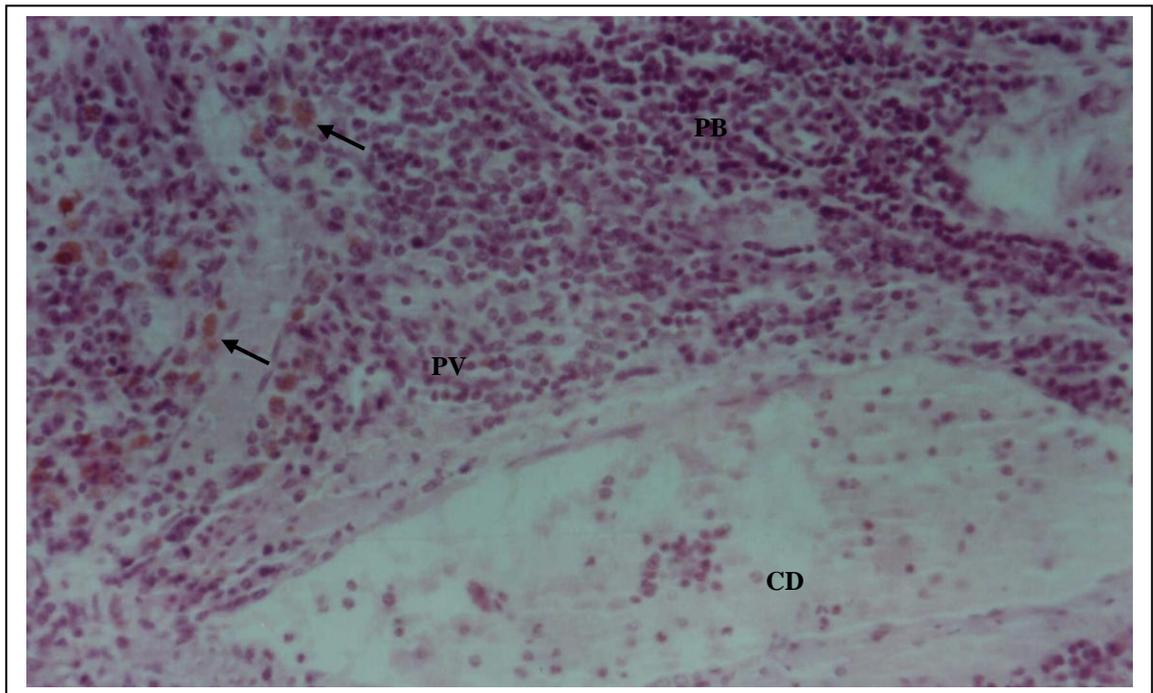


Figura 12 – Fotomicrografia de baço de rato pertencente ao grupo E₁. Observar polpa vermelha (PV), polpa branca (PB), capilar dilatado (CD) e grânulos marrons de hemossiderina no parênquima esplênico (setas). Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 180X.

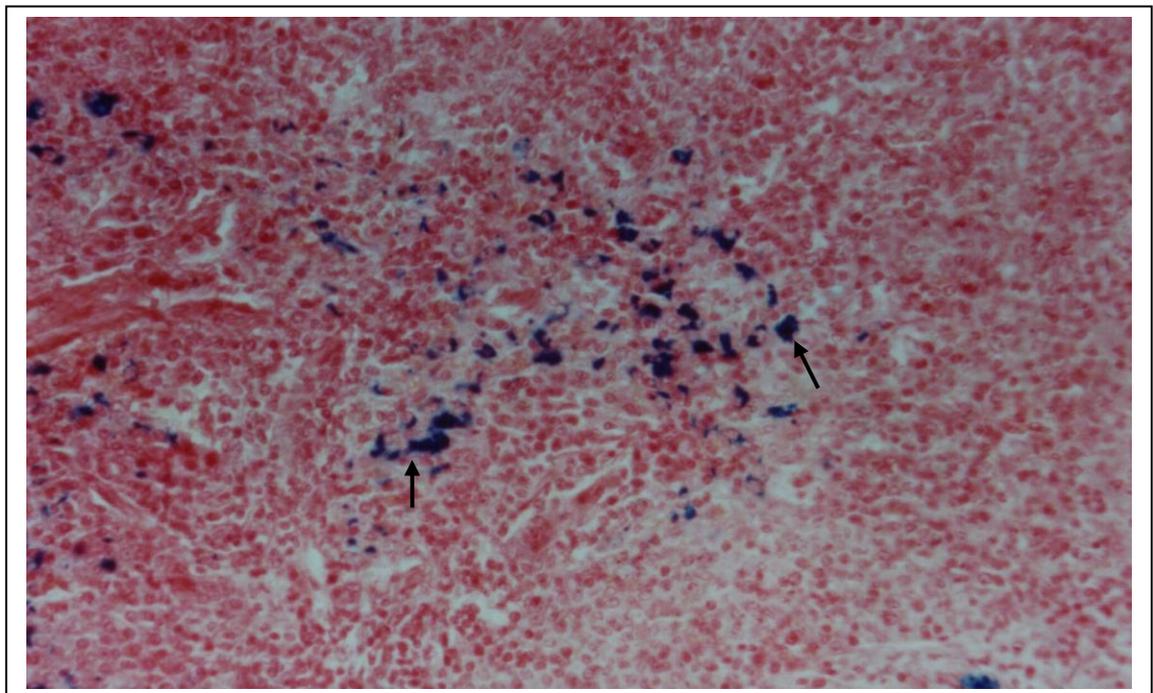


Figura 13 - Fotomicrografia de baço de rato pertencente ao grupo E₁. Observar grânulos azulados de hemossiderina no parênquima esplênico (setas). Coloração: Ferrocianeto-férrico. Aumento: 180X.

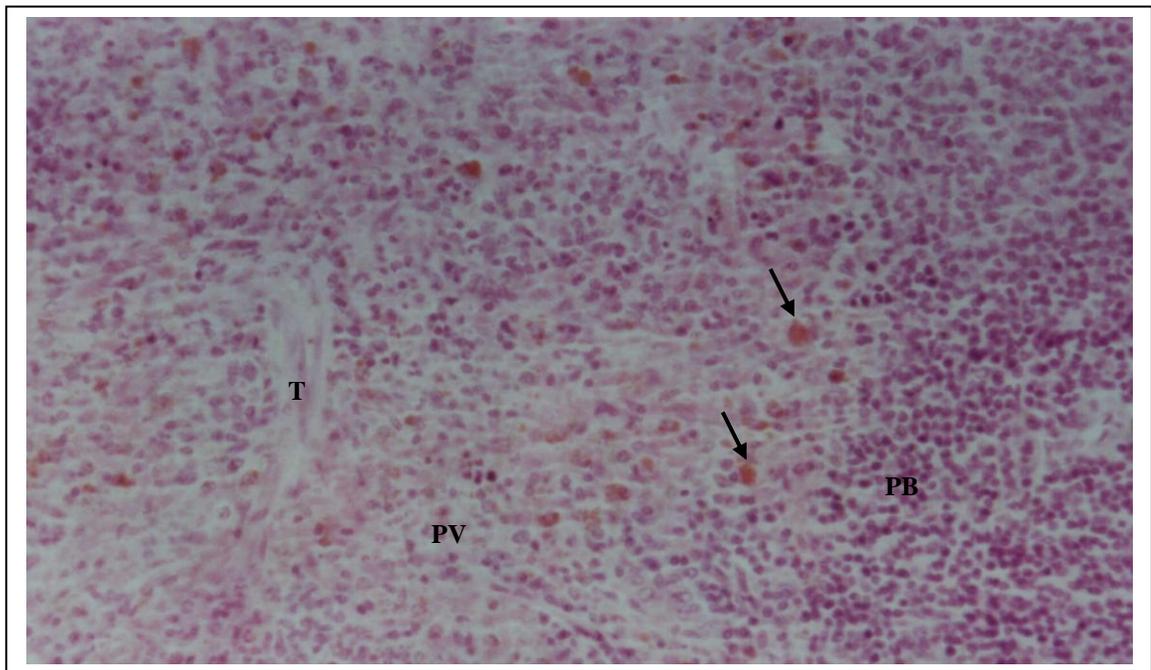


Figura 14 – Fotomicrografia de baço de rato pertencente ao grupo E₂. Observar trabéculas (T), polpa vermelha (PV), polpa branca (PB) e grânulos marrons de hemossiderina no parênquima esplênico (setas). Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 180X.

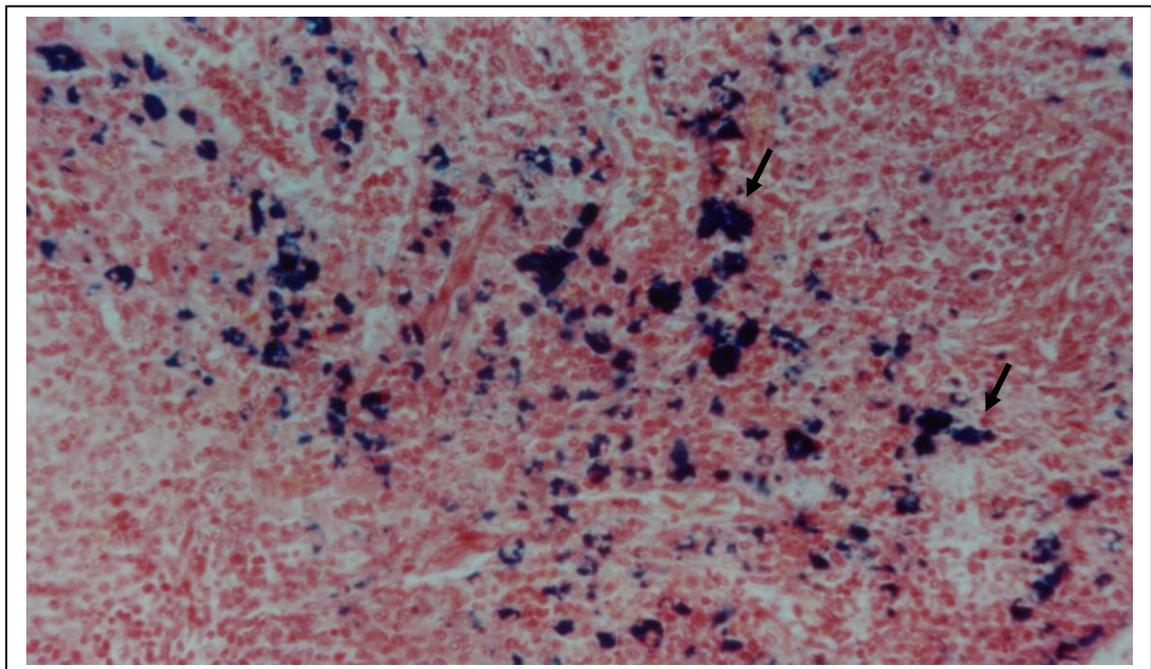


Figura 15 - Fotomicrografia de baço de rato pertencente ao grupo E₂. Observar grânulos azulados de hemossiderina no parênquima esplênico (setas). Coloração: Ferrocianeto-férrico. Aumento: 180X.

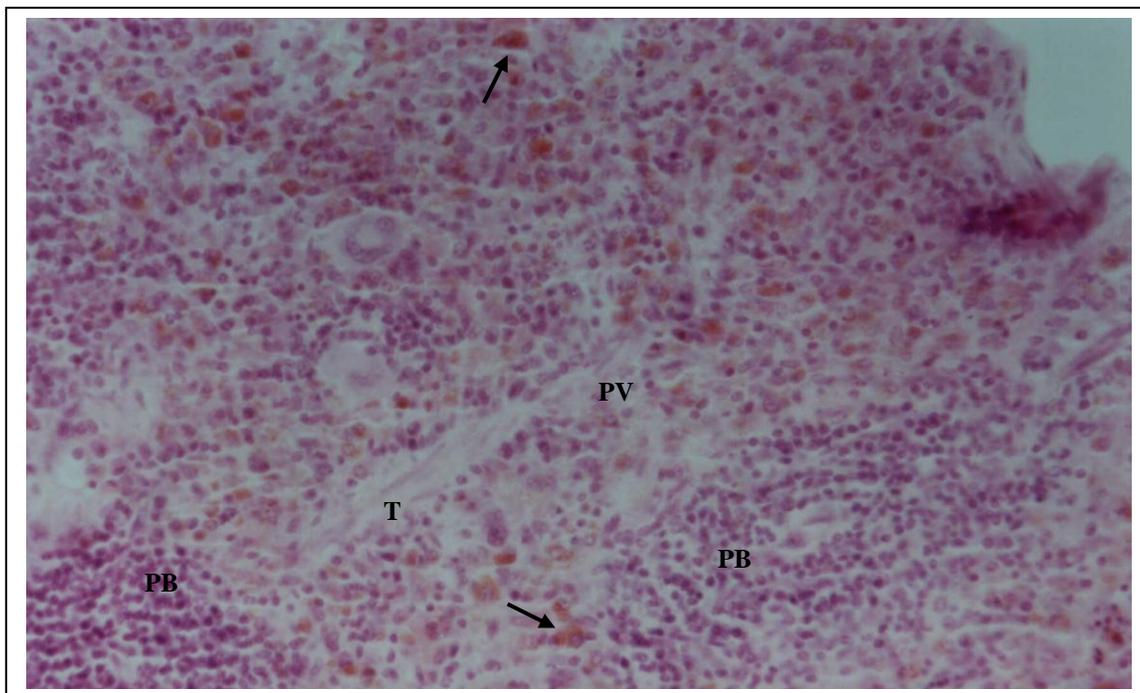


Figura 16 – Fotomicrografia de baço de rato pertencente ao grupo E₃. Observar trabéculas (T), polpa vermelha (PV), polpa branca (PB) e grânulos marrons de hemossiderina no parênquima esplênico (setas). Coloração: Hematoxilina-eosina. Aumento: 180X.

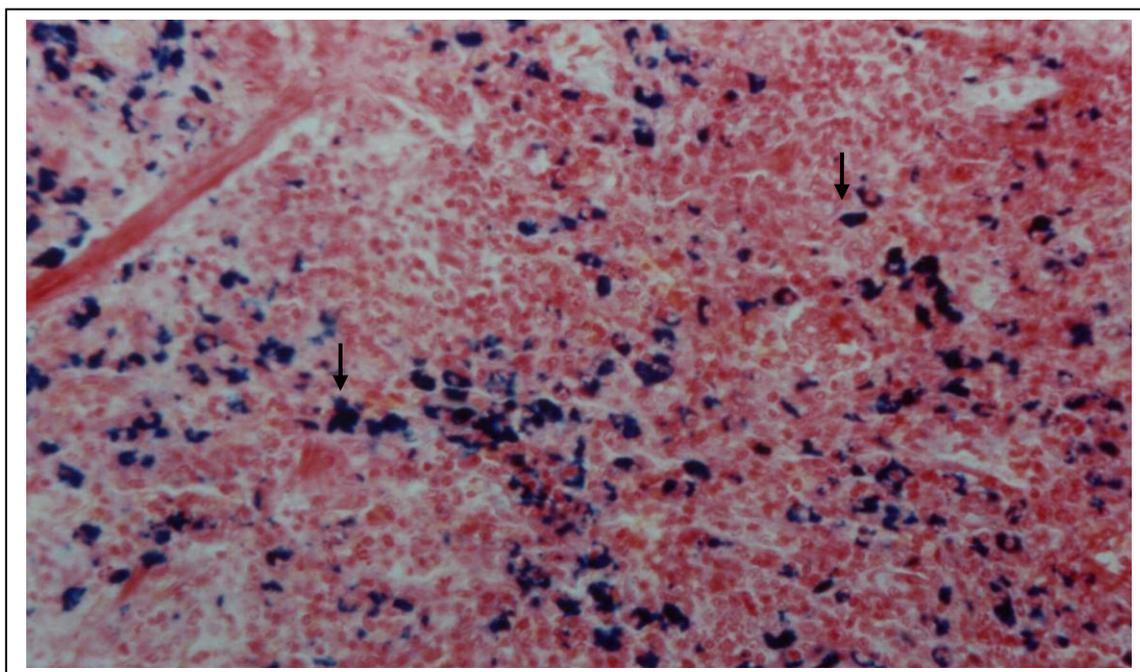


Figura 17 - Fotomicrografia de baço de rato pertencente ao grupo E₃. Observar grânulos azulados de hemossiderina no parênquima esplênico (setas). Coloração: Ferrocianeto-férrico. Aumento: 180X.

5. DISCUSSÃO

O rato foi o animal de escolha para a realização deste trabalho por ser de fácil obtenção, apresentar uma linhagem bem definida para se conseguir amostras de maior homogeneidade e por ser amplamente utilizado nos trabalhos de experimentação (SHIBAYAMA et al., 1991; HARDY et al., 1995; SÉBE, 1999a).

Vários anestésicos e tranquilizantes como thionembatal (HENS & BROSNAN, 1970), pentobarbital (HORIUCHI et al., 1995), quetamina e xilazina (SÉBE, 1999a; SPINOSA et al., 1999) e éter (ISOZAKI et al., 1992) são utilizados para anestesiarem ratos, no entanto, em nosso trabalho optou-se pela quetamina e xilazina por não apresentar alterações hepáticas, além de favorecer uma acentuada analgesia e relaxamento muscular. Mesmo não utilizados parâmetros de avaliação bioquímica nem hematológica no trabalho, a associação de quetamina e xilazina na mesma seringa administrada via intramuscular, foi utilizada no trabalho por ser de fácil aplicação e por produzir eficiente analgesia, anestesia e relaxamento muscular nos animais durante o procedimento operatório (WEISBROTH & FUDENS, 1972).

Não trabalhou-se com barbitúricos porque eles provocam relaxamento da musculatura lisa da cápsula esplênica, aumentando com isso o reservatório sanguíneo da baço, podendo interferir nos resultados apresentados pela congestão esplênica (ETTINGER, 1996).

O acesso a cavidade abdominal mais comumente utilizada 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). Esse tipo de incisão foi utilizada nos animais envolvidos no trabalho, pois possibilitou melhor acesso ao baço, hilo hepático e fígado, tornando o procedimento menos complicado.

No experimento foi utilizada a manobra de Pringle (1908) modificada, que consiste no clampeamento do hilo hepático (artéria hepática, veia porta e ducto biliar). Com tal procedimento, foi produzida a congestão esplênica, resultando na congestão do baço.

Silva e Beer (1998), em seus modelos experimentais de isquemia hepática, utilizando a manobra de Pringle, não a aplicaram como consta no trabalho original. Clampearam, tronco vascular e ducto de determinado lobo hepático. 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 (GONÇALEZ et al., 1979; FREDERIKS et al., 1982). Desta maneira, mantinham uma parte do fígado funcionando e evitavam a congestão esplâncnica. Como em nosso trabalho a congestão esplâncnica era desejada, utilizamos o método de clampeamento realizado por Sebe (1999a).

Em 1973, Derry e Slapak propuseram um novo modelo de falência hepática aguda, no qual usaram clampeamento seletivo baseado na segmentação do fígado de ratos e assim conseguiram isquemiar 70% e manter 30% com circulação normal. Com esse modelo experimental, não foi necessário promover a descompressão vascular para impedir a congestão esplâncnica. Esse método de clampeamento não foi utilizado em nosso trabalho, pois evitava a congestão esplâncnica.

Barbarino et al. (1978), trabalharam utilizando apenas a ligação da veia porta, observou que em relação ao baço, foi notada esplenomegalia, aumento do diâmetro da polpa vermelha, diminuição do número de folículos de Malpighi, que também foram notadas em nosso trabalho.

Omokava et al. (1991) em seu experimento, trabalhou 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 subcutânea, produzindo assim a anastomose porto-sistêmica, com a finalidade de evitar a congestão esplâncnica. Esse método de clampeamento não foi utilizado no presente trabalho porque envolvia diretamente o baço, que é o objeto de nosso estudo, além de não provocar a congestão esplâncnica.

No modelo experimental realizado por Sébe (1999a), utilizando-se a manobra de Pringle modificada por 10, 20 e 30 minutos, foram encontradas isquemia hepática, congestão vascular esplâncnica e isquemia intestinal. Como a congestão esplâncnica era fundamental em nosso estudo, optou-se por esse método de clampeamento.

Devido a essas variações impostas nos diferentes experimentos, os tempos de isquemia descritos como tempos de lesão hepática foram muito variáveis, indo desde 30 minutos (ISOZAKI et al., 1995) até 100 minutos (ASAKAVA et al., 1989). Possivelmente esses tempos dilatados sejam decorrentes da realização de isquemia hepática parcial ou total com derivações vascular. No experimento realizado por Sébe (1999a), os tempos de isquemia hepática foram menores justamente por se fazer isquemia total sem derivações vascular, tendo como uma das conseqüências a congestão esplâncnica. Por isso utilizou-se a metodologia desse trabalho como base em nosso experimento.

A isquemia hepática total em diferentes tempos, acarreta congestão esplâncnica, e consequentemente 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.(1999). Essas alterações também foram observadas no experimento.

Através da técnica do Ferrocianeto-férrico, foi observado um acúmulo progressivo de pigmentos férricos (hemossiderina) no parênquima esplênico, que ia aumentando a medida que aumentava o tempo de clampeamento do pedículo hepático, fato esse também relatado no trabalho realizado por Freitas et al.(2000), que poderão reagir com o peróxido de hidrogênio, produzindo hidroxil que é altamente lesivo para membranas celulares e DNA (FLAHERTY e WEISFELDT, 1988; AMBRÓSIO et al., 2000; ALENCAR, et al.,2002).

O órgão de escolha para este trabalho foi o baço, tendo como objetivo analisar macro e microscopicamente a morfologia nos diferentes tempos proposta por Sébe (1999a), uma vez que sua drenagem sangüínea é realizada pelo sistema porta-hepático.

Conforme pudemos observar nas literaturas por nós 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. Em nosso meio Sébe et al.(1999b) observaram alterações estruturais (microscopias de luz e eletrônica de transmissão) em nível das vilosidades intestinais e congestão esplâncnica após clampeamento total do pedículo hepático.

O baço, por se tratar de um órgão que possui uma infinidade de funções relevantes ao organismo, alguma até então não esclarecidas, e por estar envolvido na congestão esplâncnica durante o clampeamento do pedículo hepático nas correções cirúrgicas do fígado, deve ser melhor pesquisado.

O aumento da concentração de pigmento férrico de hemossiderina nos macrófagos esplênico durante os vários períodos de clampeamento total do hilo hepático deve ser mais bem estudado. Após a fagocitose e digestão das hemácias pelos macrófagos os pigmentos férricos são reutilizados na elaboração de novas hemácias, porém quando em grandes quantidades não se sabe qual o destino dos mesmos.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos permitiram concluir que aos 20 minutos já começa apresentar sinais de congestão esplênica, e aos 30 minutos intensa digestão de hemácias pelos macrófagos e presença de grânulos de ferro (hemossiderina) no parênquima esplênico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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. **Eur. Surg. Res.** v.21, p.42-8, 1989.

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. **Am. J. Ana.** 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.

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. **Br. J. surg.**, v. 60, p.901, 1973.

DOASSANS, C.; TORRES, M.; PRESSA, C. Vascularização esplênica. **Cir. Urug.** v. 54, p. 153-155, 1984.

EICHNER, R. R. Splenic function: normal, too much and too little. **Am. J. Med.** 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, Guanabara Koogan. 1994. p.105.

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

FORSYTH, S. F.; GUILFORD, W.G. Ischemia-reperfusion injury – a small animal perspective. **Br. Vet. J.**, 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. **Exp. Pathol.**, v.22, p.245-52, 1982.

FREITAS, S. H., SEBE, A. A., CAMARGO, L. M., SIMOES, M. J. Alterações esplênicas 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.

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

GARTNER, L. P., HIATT, J. L. **Tratado de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabra 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. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. 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.

HARDY, K. J.; TANCHEROEN, S.; SHULKES, A – Comparison of continnous versusintermittent – reperfusion during liver resection in an experimental model, **J. Surg.** v.82, p.833-36, 1995.

HENS, D. A.; BROSNAN, J. T. – Effects of ischaemia on content of metabolites in rat liver and kidney in vivo. **Biochem. J.**, v.120, p.105-11, 1970.

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. **Arch. Surg.**, 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. **Br. J. surg.**, 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. **Eur. Surg. Res.**, v.217, p.313-22, 1995.

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.

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, **J. Surg. Res.**, v.58, p.290-94, 1995.

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. **Jpn. J. Surg.**, v.21, p.50-6, 1991.

PRINGLE, J. H. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. **Ann. Surg.**, 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. 1999a. 90p. (Tese de Doutorado).

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

SHIBAYAMA, Y.; ASAKA, S.; NISHIJIMA, A. Mechanism of liver injury following ischemia. **Exp. Mol. Pathol.**, v.55, p.251-60, 1991.

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

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, 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.

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