

FÁBIO GONTIJO RODRIGUES

**ESTUDO CINTILOGRÁFICO
DA CIRCULAÇÃO ESPLÊNICA EM RATOS**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Medicina

Belo Horizonte

2013

FÁBIO GONTIJO RODRIGUES

**ESTUDO CINTILOGRÁFICO
DA CIRCULAÇÃO ESPLÊNICA EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas a Cirurgia e a Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Medicina.

Área de concentração: Resposta inflamatória a agressão tecidual.

Linha de pesquisa: Resposta imunológica na esplenectomia parcial.

Orientador: Prof. Dr. Andy Petroianu.

Faculdade de Medicina – UFMG

Belo Horizonte

2013

R696e Rodrigues, Fábio Gontijo..
Estudo cintilográfico da circulação esplênica em ratos [manuscrito]. /
Fábio Gontijo Rodrigues. - - Belo Horizonte: 2013.
61f.: il.
Orientador: Andy Petroianu.
Área de concentração: Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de
Medicina.

1. Baço/irrigação sanguínea. 2. Microcirculação. 3. Circulação
Esplâncica. 4. Ratos. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Petroianu, Andy. II.
Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título.

NLM: WH 600

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Dr. Clélio Campolina Diniz

Pró-reitor de Pós-graduação: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Pró-reitor de Pesquisa: Prof. Dr. Renato Lima dos Santos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Dr. Francisco José Penna

Coordernador do Cento de Pós-graduação: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa
Rocha

Chefe do Departamento de Cirurgia: Prof. Dr. Marcelo Eller Miranda

**Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Cirurgia
e a Oftalmologia:** Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

**Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Aplicadas a Cirurgia e a
Oftalmologia:**

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Dr. Ivana Duval de Araújo

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Renato Santiago Gomez

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Representante discente: Sumara Marques Barral

FÁBIO GONTIJO RODRIGUES

**Estudo cintilográfico da circulação
esplênica em ratos**

Tese de Doutorado

Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas a Cirurgia e a
Oftalmologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de
Minas Gerais

Belo Horizonte, 05 de Dezembro de 2013

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Prof^a. Dr^a. Vivian Resende

Prof. Dr. Marcus Vinicius Henriques Brito

Prof. Dr. Augusto Diogo Filho

Prof. Dr. Andy Petroianu - Orientador

**À minha filha Maitê,
pelo amor e por alegrar tanto nossas vidas.**

**À minha esposa, Ciça,
pelo amor, carinho e compreensão.**

AGRADECIMENTOS

Ao Grupo de Pesquisas “Avanços em Medicina”, em especial aos amigos Dra.Kelly Cristine de Lacerda Rodrigues Buzatti e Dr. Jorge Miguel Schettino César.

À Profa. Dra. Simone Odília Antunes Fernandes e ao Prof. Dr. Valbert Nascimento Cardoso, pelos ensinamentos e viabilização dos exames cintilográficos.

Ao acadêmico Eduardo de Vilhena Parreira, pelo empenho e dedicação durante todo o estudo.

Aos funcionários do biotério da Faculdade de Medicina da UFMG, Marcelo Moreira de Jesus, José Maia e Derlim Severiano de Paula, pelos cuidados dispensados aos animais.

Ao amigo Geraldo de Assis Carvalho Júnior, pelo auxílio com as figuras da tese.

Ao amigo Bruno Vilela Cunha, pelo auxílio com a formatação dos gráficos.

Ao Sr. Darly Andrade, pelo auxílio com os cálculos estatísticos.

À Banca de Qualificação, constituída pelos professores - Profa. Dra. Vivian Resende e Prof. Dr. Sérgio Alexandre da Conceição, pelas valorosas contribuições.

À FAPEMIG e ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

HOMENAGENS

A minha mãe, Cláudia, por seu apoio incondicional, amor e pela educação.

Ao meu pai, Irany, pelo exemplo.

A minha irmã, Denise, pela amizade e carinho.

Ao Dr. Sérgio Luiz de Lima pela amizade e incentivo

Às equipes da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte, da clínica “Endoscopia Clínica e Cirúrgica”, e dos Hospitais Socor, Julia Kubitscheck, Madre Teresa e Vera Cruz, pela amizade e ensinamentos.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABELAS	X
ÍNDICE DE GRÁFICOS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	XIV
1. RESUMO	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUÇÃO	5
3.1 Aspectos gerais	5
3.2 Histologia	7
3.3 Propedêutica imagiológica e cintilográfica.....	8
4. OBJETIVO	10
5. RELEVÂNCIA	11
6. MÉTODO	12
6.1 Ética	12
6.2 Material e delineamento experimental	12
6.2.1 Animais e cuidados	12
6.2.2 Distribuição dos animais e protocolo de estudo	13
6.2.3 Ato anestésico	14
6.2.4 Ato operatório	15
6.3 Exame cintilográfico	19
6.3.1 Cuidados com os animais	20
6.3.2 Esplenectomia e morte dos animais	21
6.4 Análise estatística	22
7. RESULTADOS	25
7.1 Considerações gerais.....	25
7.2 Peso dos animais e peso médio do baço	25

7.3 Pertecnetato de sódio injetado e percentual de dose injetada por grama de baço.....	26
7.4 Imagens cintilográficas	28
8. DISCUSSÃO	31
8.1 Animais e material	31
8.2 Ato anestésico e operatório	33
8.3 Resultados do estudo e microcirculação esplênica	34
9. CONCLUSÃO	38
10. REFERÊNCIAS	39
11. APÊNDICES	44

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1: Cálculo amostral do números de ratos estudados em cada grupo.....	23
TABELA 2: Valores p para as variáveis %DI/g e pertecnetato de sódio injetado, pelo modelo linear generalizado.....	27
TABELA 1A: Peso de todos os ratos nos grupos estudados.....	44
TABELA 2A: : Peso de todos os ratos e seus baços, utilizados para o cálculo do peso médio do baço.....	45
TABELA 3A: Valores do pertecnetato de sódio injetado em cada rato dos grupos estudados.....	46
TABELA 4A: Valores de radiação medidos no baço e seus respectivos padrões de dose, nos ratos dos grupos estudados.....	47

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1: Curva de potência.....	23
GRÁFICO 2: Média dos pesos dos animais nos diferentes grupos: estudados.....	26
GRÁFICO 3: Valores médios do pertecnetato de sódio injetado a cada grupo estudado.....	27
GRÁFICO 4: Valores médios do percentual da dose injetada por grama de baço, nos grupos estudados.....	28

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Anatomia arterial no rato.....	6
FIGURA 2: Exposição dos vasos retroperitoneais, aorta e veia cava do Rato 3, do grupo 2.....	16
FIGURA 3: Após a ligadura da aorta acima de sua bifurcação, injeção do pertecnetato de sódio no Rato 2, do Grupo 2.....	17
FIGURA 4: Dissecção da artéria gástrica esquerda com o auxílio de uma pinça de Kelly, para sua ligadura no Rato 1, do Grupo 4.....	17
FIGURA 5: Pinçamento dos vasos esplenogástricos, para sua ligadura e secção no Rato 1, do Grupo 4.....	18
FIGURA 6: Manutenção dos vasos esplênicos, incluindo os esplenogástricos, no Rato 4, do Grupo 6.....	18
FIGURA 7: Aparelho de gamacâmara acoplada a computador no Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia da UFMG.....	20
FIGURA 8: Aparelho contador automático Wizard 3" 1480 do Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia da UFMG.....	22
FIGURA 9: Cintilografia do Rato 2 do Grupo baço - 90 minutos A: Imagem obtida após 20 minutos da injeção do pertecnetato de sódio, com concentração do radioisótopo na região do baço e estômago. B: Imagem obtida após 90 minutos da injeção do pertecnetato, com concentração do radioisótopo na região de baço e estômago e captação pela glândula tireoide. Diminuição da atividade radioativa na região central toracoabdominal.....	29

FIGURA 10: Imagem obtida em Ratos dos Grupos estômago e baço (30 e 90 minutos) A: Imagem do Rato 1 do Grupo estômago e baço – 30 minutos, após 20 minutos de injeção do pertecnetato de sódio, com maior concentração do radioisótopo na região abdominal. B: Imagem do Rato 2 do Grupo baço e estômago – 90 minutos, após 90 minutos decorridos da injeção do radioisótopo, mostrando captação na região abdominal (estômago e baço) e também pela glândula tireoide. Diminuição da atividade radioativa na região central toracoabdominal..... 30

FIGURA 11: Imagem obtida no Rato 3 do Grupo controle - 90 minutos. Em ambas há a captação do radioisótopo na região abdominal (estômago e baço) e pela glândula tireoide. A: após 20 minutos da injeção do radioisótopo. B: após 90 minutos da injeção do radioisótopo. Diminuição da atividade radioativa na região central toracoabdominal..... 30

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CEBIO	Centro de Bioterismo
CETEA	Centro de Ética em Experimentação Animal
cm	centímetro
CNEN	Comissão Nacional de Energia Nuclear
cpm	Contagens por minuto
<i>et al.</i>	E outros
EUA	Estados Unidos da América
g	Grama
GO	Goiás
<i>Inc</i>	<i>Incorporated</i>
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
keV	Quilo elétron-volt
kg	Quilograma
l	Litro
MBq	Megabequerel
min	Minutos
mg/kg	Miligramas por quilograma
MG	Minas Gerais
ml	Mililitro
NJ	<i>New Jersey</i>
μCi	Micro-Curie
μm	Micrômetro
n	Número
p	Probabilidade de significância
PALS	<i>Periarterial lymphatic sheat</i>
Prof.	Professor
PVC	Policloreto de vinila
RJ	Rio de Janeiro
ROI	<i>Regions of interest</i>

RS	Rio Grande do Sul
SP	São Paulo
S/A	Sociedade anônima
SLU	Superintendência de Limpeza Urbana
Tc	Tecnécio
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
$\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$	pertecnato de sódio
99mTc	99 meta tecnécio
=	Igual a
®	<i>Registered</i>
%	Percentual
% DI/g	Percentual de dose injetada por grama

1. RESUMO

O baço humano apresenta fluxo sanguíneo de 350 l/dia. Sua microcirculação e a dinâmica da movimentação celular ainda não são compreendidas. A circulação fechada representa menos de 10% do fluxo, enquanto a circulação aberta conduz o sangue para o parênquima da polpa vermelha. O objetivo deste estudo foi avaliar a distribuição sanguínea vasculoparenquimatosa do baço, por meio de estudo cintilográfico em ratos.

Trinta ratos da raça *Wistar* foram distribuídos aleatoriamente em seis grupos (n=5). Grupo 1 (baço – 30 minutos) e Grupo 2 (baço – 90 minutos): submetidos a laparotomia com direcionamento do fluxo sanguíneo para o baço, por meio de ligadura da aorta próxima à bifurcação das ilíacas e dos vasos esplâncnicos, mantendo apenas a artéria esplênica; Grupo 3 (baço e estômago – 30 minutos) e Grupo 4 (baço e estômago – 90 minutos): submetidos a laparotomia com direcionamento do fluxo sanguíneo para baço e estômago, por meio de ligadura da aorta próxima da bifurcação das ilíacas e dos vasos esplâncnicos, com manutenção do fluxo pelas artérias esplênica, gástrica e vasos esplenogástricos; Grupo 5 (controle – 30 minutos) e Grupo 6 (controle – 90 minutos): submetidos a laparotomia e ligadura da aorta próxima à bifurcação das ilíacas, mantendo o fluxo para os órgãos abdominais. Após as ligaduras arteriais, os animais receberam injeção de 0,2 ml de pertecnetato de sódio na aorta. Os animais foram observados pelo período de 30 ou 90 minutos, de acordo com a distribuição entre os grupos. Foram realizadas imagens cintilográficas em aparelho de gamacâmara. Ao final do período de observação os animais tiveram o baço retirado para contagem radioativa em aparelho contador automático.

Não houve diferença nos valores de radiação do baço entre os grupos, indicando retenção do radioisótopo pelo baço, mesmo após o período de 90 minutos.

Concluindo, o fluxo sanguíneo através do baço não é contínuo. O sangue difunde-se pelo parênquima esplênico e sua drenagem venosa é lenta, não seguindo sequência previsível.

Palavras-chave: Baço/Irrigação sanguínea. Microcirculação. Circulação esplâncnica. Ratos.

2. ABSTRACT

The blood flow of the human spleen is 350 liters per day. The splenic microcirculation and the dynamics of cell movement within this organ are not completely understood. The closed circulation within the arterioles, capillaries and venules is responsible for less than 10 % of blood flow inside the splenic parenchyma. In the open circulation, most of the blood flows through the perivascular space inside the red pulp of the splenic parenchyma.

The aim of this study was to evaluate the vasculoparenchymal blood circulation of the spleen by means of scintigraphic study in rats.

Thirty Wistar rats were randomly distributed into six groups (n=5). Group 1 (spleen – 30 minutes) and Group 2 (spleen – 90 minutes): the rats were laparotomised and the aorta was ligated right above the iliac vessels, the splanchnic arteries were ligated as well, in order to direct the blood flow to the spleen. Group 3 (spleen and stomach – 30 minutes) and Group 4 (spleen and stomach – 90 minutes): the rats were laparotomised and the aorta was ligated right above the iliac vessels, the splanchnic arteries were ligated as well, preserving the blood flow by splenic and gastric arteries and splenogastric vessels. Group 5 (control – 30 minutes) and Group 6 (control – 90 minutes): the rats were laparotomised and the aorta was ligated near the iliac vessels. Maintaining the blood flow to the abdominal organs. After ligating these vessels, the animals were submitted to injection of 0.2 ml of sodium pertechnetate in the aorta. The animals were observed for 30 or 90 minutes according to the group they belonged. Scintigraphic images were made in a gamma camera. At the end of

the following period, the animals have had the spleen removed for radiation counting in an automatic counter.

There was no difference in the splenic radiation counts between these groups, showing that there is a retention of the radioisotope in the spleen, even after 90 minutes.

In conclusion, the splenic blood flow is not continuous. The blood flows into the splenic parenchyma and its drainage is slow, not following in a predictable sequence.

Key words: Spleen/Blood supply. Microcirculation. Splanchnic circulation. Rats.

3. INTRODUÇÃO

3.1 Aspectos gerais

O fluxo sanguíneo do baço humano é cerca de 350 litros de sangue por dia. Sua irrigação se faz pela artéria esplênica, pelos vasos esplenogástricos e através de vasos colaterais, que incluem artérias polares, artérias pancreáticas e artéria gastro-omental esquerda. A avaliação da função esplênica e do tamanho do baço em crianças e adolescentes normais submetidos a angioembolização da artéria esplênica, devido a trauma não mostrou diferença em relação a esses aspectos. No entanto, esse procedimento não é isento de riscos, sendo descritos abscessos e infartos esplênicos (EKEH *et al.*, 2013; SKATTUM *et al.*, 2012). A ligadura dos vasos esplenogástricos também é associada a abscessos do baço, por hipoperfusão de seu pólo superior (MARTINEZ; SANCHES; GARCIA, 2008).

A artéria esplênica origina vários ramos pancreáticos e a artéria gastro-omental esquerda antes de bifurcar-se (84%-90%) ou trifurcar-se (10%-16%), originando as artérias lobares e segmentares do baço (CORTÉS; GÓMEZ PELLICO, 1988; GUPTA *et al.*, 1976). Há dois ramos da artéria esplênica, que nutrem os polos superior ou cranial e o inferior ou caudal do baço. A vascularização e distribuição anatômica dos órgãos abdominais no rato são análogas às encontradas em humanos (FIGURA 1).

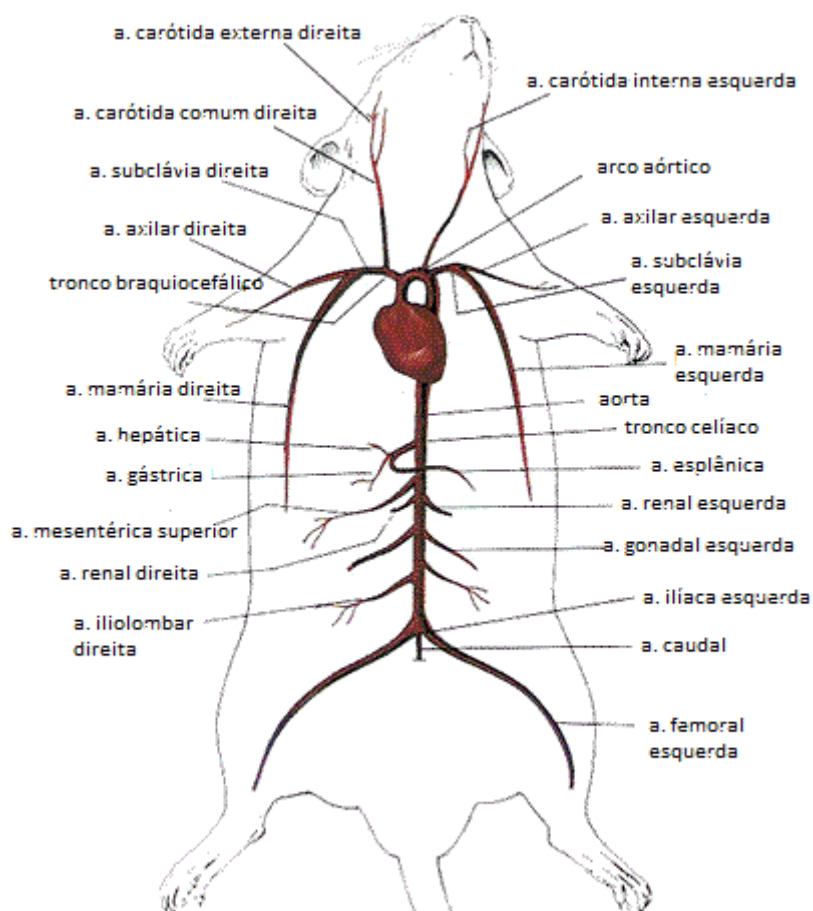


FIGURA 1: Anatomia arterial no rato.

A drenagem venosa é feita pela união de afluentes venosos que saem do baço para formar a veia esplênica. A distribuição venosa do baço segue o mesmo padrão da irrigação arterial. A veia esplênica junta-se com a veia mesentérica superior para formar a veia porta (SKANDALAKIS *et al.*, 1993).

3.2 Histologia

Em todos os mamíferos, o tecido esplênico é dividido em duas polpas. A polpa branca é constituída por acúmulo de linfócitos, que seguem as artérias, após elas deixarem as trabéculas. A polpa vermelha é formada por cordões de macrófagos e leucócitos, chamados cordões esplênicos de Billroth, e por seios venosos. No interior do baço, as artérias seguem pelas trabéculas, como artérias trabeculares, que se subdividem. Ao deixarem as trabéculas, as artérias são circundadas pela polpa branca, na forma de uma bainha de linfócitos (*periarterial lymphatic sheat* - PALS) (ELMORE, 2006; PETROIANU, 2003,1993; MARQUES; PETROIANU; COELHO, 2003; MARQUES & PETROIANU, 2003; PETROIANU & BERINDOAGUE NETO, 2006; PETROIANU *et al.*, 2010,2008,2006,2004; ALBERTI *et al.*, 2012,2007; CALDEIRA *et al.*,2005; REZENDE *et al.*,2007; MARQUES *et al.*, 2004,2002).

A artéria que percorre o parênquima esplênico envolta pela bainha PALS, é chamada de artéria folicular. Ramos arteriulares saem dessa artéria e terminam na zona perifolicular. Ao dividir-se na polpa branca, a artéria folicular perde sua bainha, originando múltiplas arteríolas com forma similar à de um pincel, sendo por isso denominadas de arteríolas peniciladas. Essas arteríolas penetram na polpa vermelha e podem apresentar-se envolvidas por uma bainha de macrófagos, chamada de bainha de Schweigger-Seidel ou elipsoides (ROBINSON, 1926). Entre as polpas branca e vermelha localiza-se a zona perifolicular, onde ocorrem as reações contra antígenos, por meio de circulação aberta, na qual o sangue entra em contato com as células do baço, dando início às reações imunitárias. A microcirculação esplênica e a dinâmica da

movimentação celular ainda não são totalmente compreendidas (CHEN, 1978; ARNON *et al.*, 2013).

3.3 Propedêutica imaginológica e cintilográfica

A avaliação cintilográfica do baço tem sido substituída por ultrassonografia com Doppler, tomografia computadorizada e ressonância nuclear magnética. Entretanto, a cintilografia ainda é importante, quando se pretende proceder a avaliação funcional do baço, já que a maioria dos estudos baseia-se na remoção de partículas coloidais marcadas com radionuclídeos, pelos macrófagos esplênicos. Entre os radiofármacos, o mais utilizado para estudo do baço é o coloide de enxofre marcado com 99 meta-tecnécio (^{99m}Tc). Outros coloides utilizados para os estudos esplênicos são o fitato de sódio e o estanho (EHRlich *et al.*, 1982; PHOM *et al.*, 2004).

Mesmo sendo captado mais intensamente pelo fígado, o fitato é utilizado no estudo do baço devido à sua facilidade de preparação. Quando se deseja obter imagens esplênicas sem interferência do fígado, podem-se usar hemácias autógenas marcadas com enxofre coloidal- ^{99m}Tc (MENTH *et al.*, 2009). Essa técnica é menos adotada, por ser mais trabalhosa. Bactérias radiomarcadas podem ser empregadas em estudos cintilográficos (DINIZ *et al.*, 1999). A função de baços operados foi pesquisada em estudo que avaliou a fagocitose de *Escherichia coli* marcadas com ^{99m}Tc (PETROIANU, 2010).

Outro radioisótopo utilizado nos estudos cintilográficos é o pertecnetato de sódio ($\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4$), que é obtido pela eluição de ^{99m}Tc em solução salina. O pertecnetato de sódio tem meia vida curta - cerca de seis horas - e sua emissão

de energia gama com 140 KeV torna-o adequado para o estudo cintilográfico de órgãos (CHACON *et al.*, 2007; VALENCA *et al.*, 2005). Por ser uma solução salina, não sofre opsonização nem é fagocitada por células do sistema mononuclear fagocitário. A molécula do radioisótopo também é inerte à ação das células de defesa orgânicas, portanto o comportamento desse radiofármaco é de um líquido aquoso iso-osmolar diluído no sangue, sem antigenicidade.

4. OBJETIVO

- Estudar o fluxo sanguíneo vasculoparenquimatoso do baço, com vista à entrada e saída sanguíneas desse órgão, por meio de estudo cintilográfico.

5. RELEVÂNCIA

Este estudo faz parte de uma linha de pesquisas sobre o baço. Estudos prévios sobre anatomia, função e operações esplênicas foram realizados com o intuito de preservar o órgão e suas funções.

O baço é o único órgão sobre o qual ainda não se tem conhecimento adequado de sua circulação. As informações trazidas por este estudo poderão contribuir para o entendimento da circulação vasculoparenquimatosa do baço, ao verificar como o fluxo sanguíneo distribui-se no parênquima esplênico antes de sua saída pelas veias do baço.

Estudo piloto deste trabalho mostrou a impossibilidade de remover o sangue esplênico, por meio de infusão hídrica à semelhança de outros órgãos em procedimentos de transplante, por exemplo. Cabe verificar o comportamento do fluxo esplênico para esclarecer essa sua característica.

Apesar de conhecida desde Galeno (século II), a relação existente entre o baço e o estômago, ainda não foi determinada a associação desses dois órgãos, por meio de seu fluxo sanguíneo, com especial destaque para os vasos esplenogástricos, previamente denominados ducto de Galeno e incluídos inapropriadamente entre os vasos gástricos curtos.

6. MÉTODO

6.1 Ética

Este trabalho foi realizado de acordo com as recomendações das Normas Internacionais de Proteção aos Animais e do Código Brasileiro de Experimentação Animal (PETROIANU, 2000; ROLLIN, 2006; MARQUES; MORALES; PETROIANU, 2009). O projeto desta pesquisa foi aprovado pela Câmara do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA) em 28/04/2010, protocolo nº 220/2009 (APÊNDICE 11.1).

6.2 Material e delineamento experimental

6.2.1 Animais e cuidados

Este estudo teve como modelo ratos da raça *Wistar (Rattus norvegicus)* adultos fêmeas, provenientes do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais foram identificados e alocados no Biotério da Faculdade de Medicina da UFMG, onde permaneceram em gaiolas - cinco animais por gaiola -, recebendo ração própria para ratos e água à vontade.

Os animais permaneceram em observação pelo período de 15 dias, durante os quais foram submetidos a exame ectoscópico em busca de anormalidades que os excluíssem deste estudo.

6.2.2 Distribuição dos animais e protocolo do estudo

Foram distribuídos aleatoriamente 30 ratos em seis grupos (n=5):

Grupo 1 – controle 30 minutos: ratos submetidos a laparotomia e ligadura da aorta, proximal à bifurcação das artérias ilíacas, e injeção intra-aórtica de pertecnetato de sódio. Os animais foram mortos após 30 minutos e submetidos a esplenectomia.

Grupo 2 – controle 90 minutos: ratos submetidos a laparotomia e ligadura da aorta, proximal à bifurcação das artérias ilíacas, e injeção intra-aórtica de pertecnetato de sódio. Os animais foram mortos após 90 minutos e submetidos a esplenectomia.

Grupo 3 – baço 30 minutos: ratos submetidos a laparotomia e ligadura da aorta proximal à bifurcação das artérias ilíacas e de seus ramos viscerais, com preservação apenas da artéria esplênica, para conduzir o fluxo do pertecnetato de sódio injetado no sentido do baço. Os animais foram mortos após 30 minutos e submetidos a esplenectomia.

Grupo 4 – baço 90 minutos: ratos submetidos a laparotomia e ligadura da aorta, proximal à bifurcação das artérias ilíacas, e de seus ramos viscerais, com preservação apenas da artéria esplênica, para conduzir o fluxo do pertecnetato de sódio injetado no sentido do baço. Os animais foram mortos após 90 minutos e submetidos a esplenectomia.

Grupo 5 – baço e estômago 30 minutos: ratos submetidos a laparotomia e ligadura da aorta, proximal à bifurcação das artérias ilíacas e de seus ramos viscerais, com preservação das artérias esplênica e gástrica esquerda, para conduzir o fluxo do pertecnetato de sódio no sentido do baço e do estômago. Foram mantidos os vasos esplenogástricos. Os animais foram mortos após 30 minutos e submetidos a esplenectomia.

Grupo 6 – baço e estômago 90 minutos: ratos submetidos a laparotomia e ligadura da aorta, proximal à bifurcação das artérias ilíacas e de seus ramos viscerais, com preservação das artérias esplênica e gástrica, para conduzir o fluxo do pertecnetato de sódio no sentido do baço e do estômago. Foram mantidos os vasos esplenogástricos. Os animais foram mortos após 90 minutos e submetidos a esplenectomia.

6.2.3 Ato anestésico

Os animais foram anestesiados com injeção de cloridrato de quetamina – 80 mg/kg (Dopalen ®, Vetbrands, Jacareí, SP) associado a cloridrato de xilazina 15 mg/kg (Xilazin ®, Syntec, Hortolândia, SP) intramuscular na coxa direita. O animal foi mantido em respiração espontânea. Durante todo o período de anestesia, foram observadas as frequência respiratórias e cardíaca, além da movimentação espontânea dos animais, com vista à detecção do nível de anestesia e de possíveis complicações. Durante o período de observação, até o momento da morte dos animais, foram injetadas doses anestésicas suplementares com metade da dose de quetamina, quando os animais mostraram sinais de superficialização do plano anestésico.

6.2.4 Ato operatório

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados no Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia da UFMG, obedecendo às normas técnicas de assepsia e antissepsia.

Os instrumentos cirúrgicos, da marca Edlo® S/A. Produtos Médicos (Canoas-RS) utilizados nas operações foram: bisturi de lâmina móvel (cabo nº 3, lâmina nº 15), tesoura de Mayo-Stille reta, tesoura de Metzemaum, pinça de dissecação serrilhada, pinça de dissecação com dentes, pinças de Kelly retas, pinças de Kelly curvas, pinças de Allis, porta-agulhas de Mayo-Hegar, afastador autostático de Weitlaner, pinça vascular *bulldog* curva, materiais para microcirurgia da marca Rhosse® Instrumentos e Equipamentos Cirúrgicos Ltda. (Ribeirão Preto-SP): pinça para microcirurgia curva, tesoura para microcirurgia *Castroviejo* curva.

Após a indução anestésica os animais foram posicionados em decúbito dorsal sobre pranchas de polietileno cobertas com filme plástico de policloreto de vinila (PVC). Suas patas foram mantidas abduzidas, fixadas com fita adesiva. Realizaram-se depilação e antissepsia da parede abdominal, com polivinilpirrolidona (Riodene ® Iodopovidona degermante, Rioquímica, São José do Rio Preto-SP) e colocação de campo cirúrgico fenestrado estéril.

Os ratos foram submetidos a laparotomia mediana xifopúbica. Explorou-se a cavidade abdominal visando a identificar alterações que iriam excluir o animal do estudo.

Nos animais dos grupos 1 e 2, o intestino delgado foi deslocado para expor os vasos retroperitoneais. A aorta foi dissecada e ligada próximo à bifurcação das artérias ilíacas (FIGURAS 2 e 3).

Nos animais dos grupos 3 e 4, além dos procedimentos descritos para os grupos 1 e 2, realizou-se nefrectomia bilateral, por meio de ligadura do pedículo vascular renal com fio monofilamentar de náilon 5-0 (Shalon, Goiânia-GO) e retirada de ambos os rins da cavidade abdominal. Foram ligadas as artérias mesentérica superior, hepática comum, gastroduodenal, gástrica esquerda (FIGURA 4) e mesentérica inferior e vasos esplenogástricos (FIGURA 5) com fio monofilamentar de náilon 5-0 (Shalon, Goiânia-GO).

Nos animais dos grupos 5 e 6 foram realizados os procedimentos similares aos descritos para os grupos 3 e 4, com exceção das ligaduras da artéria gástrica esquerda e dos vasos esplenogástricos, cujos fluxos sanguíneos foram mantidos (FIGURA 6).

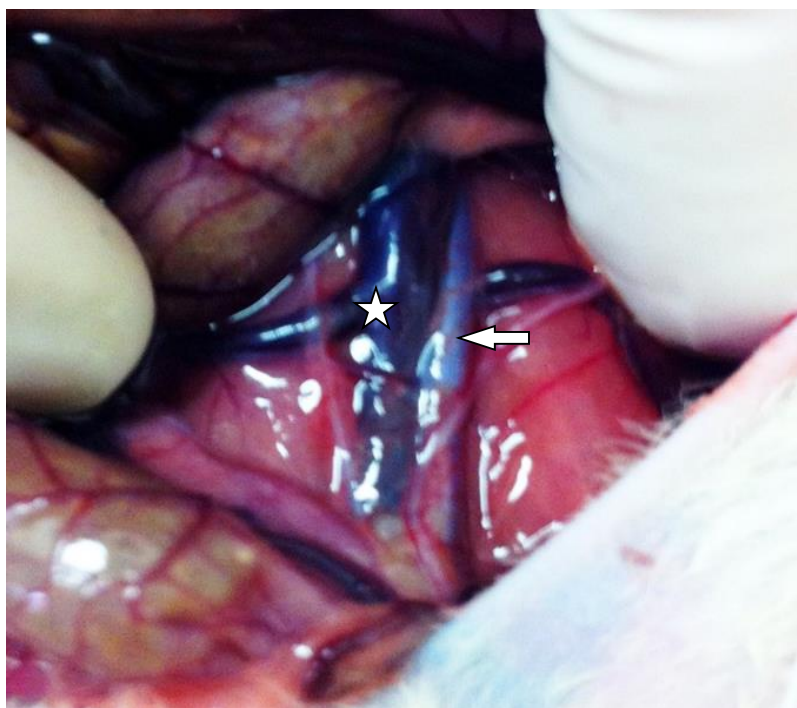


FIGURA 2: Exposição dos vasos retroperitoneais, aorta (seta) e veia cava (☆) do Rato 3 do Grupo 2.

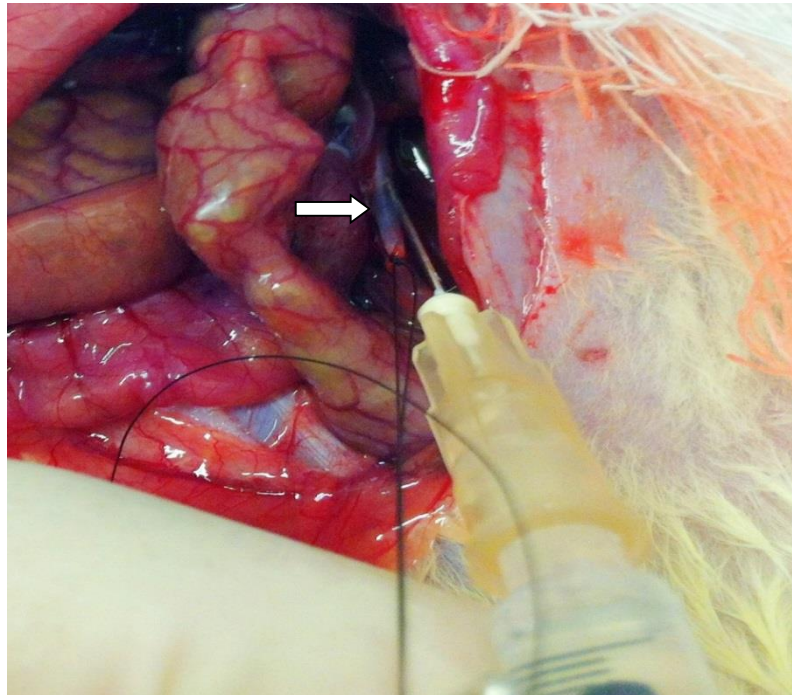


FIGURA 3: Injeção do pertecnetato de sódio no Rato 2 do Grupo 2, após a ligadura da aorta acima de sua bifurcação (seta).

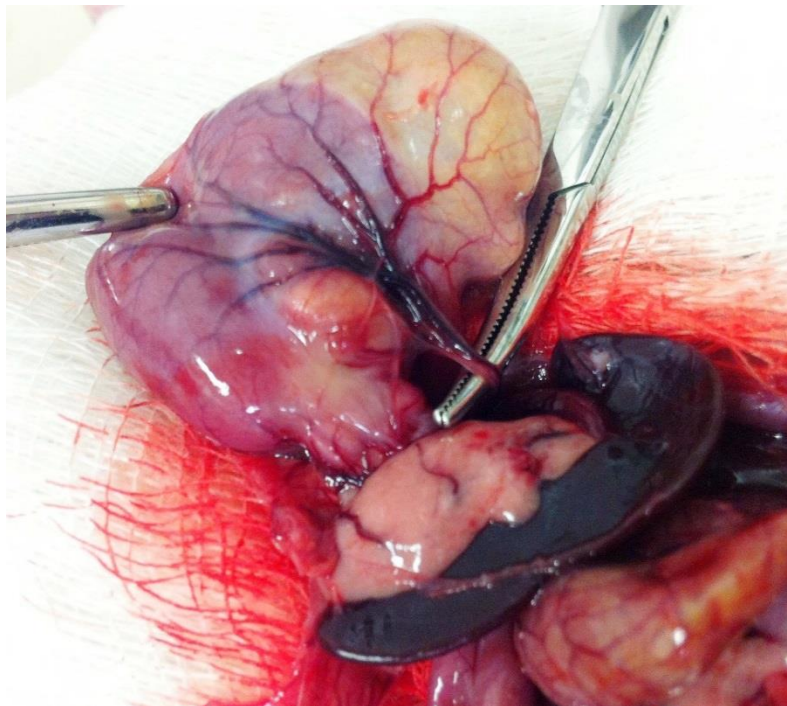


FIGURA 4: Dissecção da artéria gástrica esquerda com auxílio de uma pinça de Kelly, para sua ligadura no Rato 1 do Grupo 4.

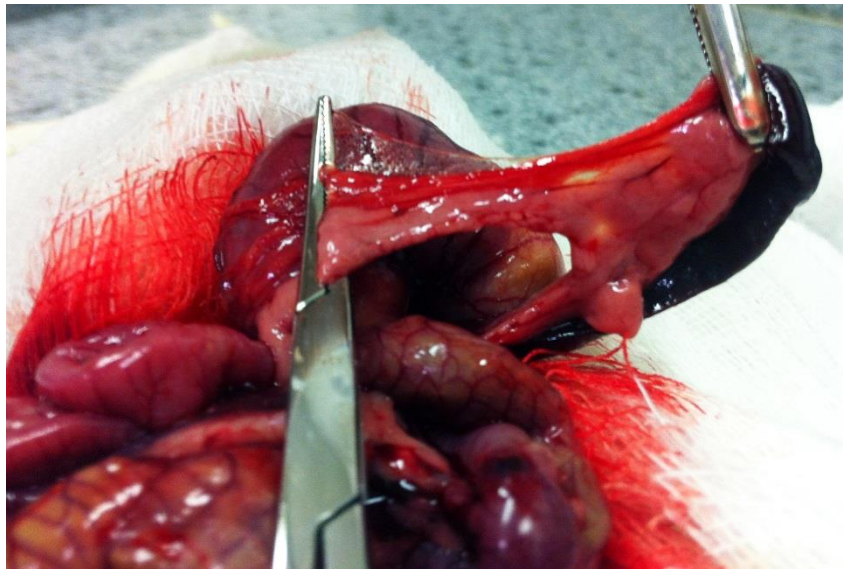


FIGURA 5: Pinçamento dos vasos esplenogástricos, para sua ligadura e secção no Rato 1 do Grupo 4.

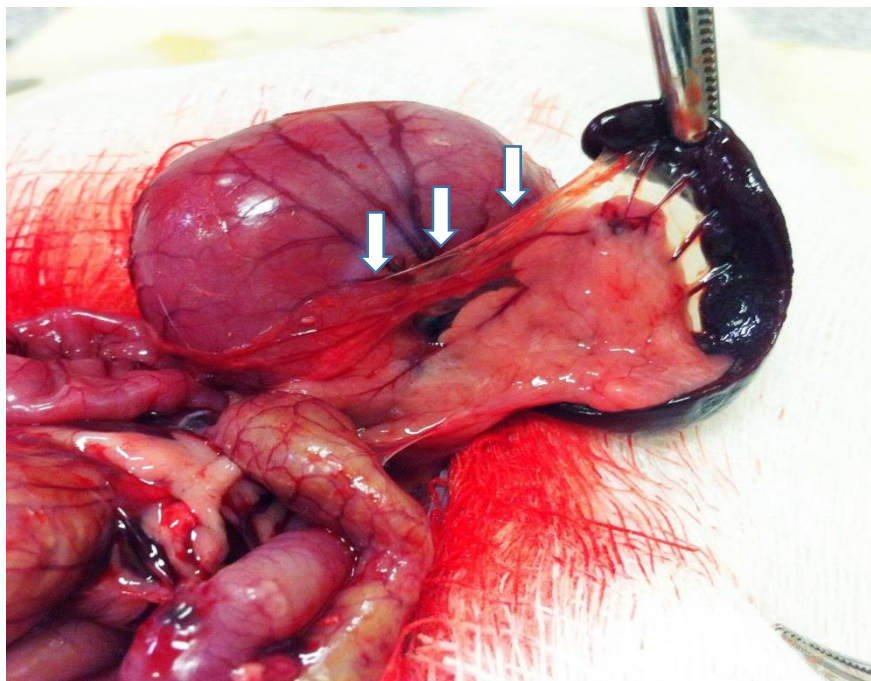


FIGURA 6: Manutenção dos vasos esplênicos, incluindo os esplenogástricos (setas), no Rato 4, do Grupo 6.

6.3 Exame cintilográfico

Após as ligaduras arteriais, os animais receberam injeção de 0,2 ml de pertecnetato de sódio na aorta. Em seguida, o orifício resultante da injeção foi ocluído com pinça vascular *bulldog*, para evitar sangramento e saída de material radioativo para a cavidade abdominal. O material foi preparado e fornecido pelo Laboratório de Radiofarmacologia da Faculdade de Farmácia da UFMG. O tecnécio (Tc) foi obtido a partir de um gerador de ^{99m}Tc com atividade de 9,25 GBq do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – Comissão Nacional de Energia Nuclear (IPEN-CNEN) de São Paulo. O tecnécio foi diluído em solução salina estéril, para conter atividade aproximada de 200 μCi em 0,2 ml de solução. Cada seringa, contendo a solução radiomarcada, teve sua atividade medida. Após a injeção do material radioativo, verificou-se a atividade remanescente na seringa, para proceder à subtração do total medido antes da injeção, obtendo, assim, o total que foi injetado nos animais.

As aferições foram feitas no aparelho calibrador de dose CRC-15R da empresa Capintec, Inc. (Ramsey, NJ, Estados Unidos da América - EUA). Seringa de 1 ml contendo a solução com o radiofármaco em 0,2 ml foi preparada como padrão de dose para que o decaimento radioativo, em função do tempo, pudesse ser levado em consideração na avaliação final.

Após a injeção do material radioativo utilizando-se agulhas de 8mm x 0,3mm, iniciou-se o estudo cintilográfico, por meio do aparelho de gamacâmara (FIGURA 7). Foi utilizada a câmara cintilográfica para animais Nucline™ TH22, da empresa Mediso Ltda. (Budapeste, Hungria). Foram confeccionadas imagens estáticas, com período de aquisição de cinco minutos. As imagens foram

realizadas imediatamente após a injeção de 0,2 ml da solução radioativa na aorta de cada rato e após 10, 20 e 80 minutos.



FIGURA 7: Aparelho de gamacâmara (seta) acoplada a computador (☆) no Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia da UFMG.

6.3.1 Cuidados com os animais

Os animais foram observados durante todo o período cintilográfico, para verificar o plano anestésico. Como os animais permaneceram laparotomizados, foram colocadas gazes estéreis embebidas em solução salina sobre os órgãos abdominais expostos, com o intuito de evitar sua desidratação.

6.3.2 Esplenectomia e morte dos animais

Após o término da coleta de imagens na gamacâmara (30 minutos ou 90 minutos), ligou-se o pedículo vascular esplênico com fio de náilon 5-0 (Shalon, Goiânia-GO) e o baço foi retirado para contagem radioativa. Os animais foram mortos por sobredosagem de anestésico (200 mg/kg de quetamina + 25 mg/kg xilazina injetada no peritônio).

Os baços retirados tiveram sua atividade radioativa medida em aparelho contador automático *Wizard 3* 1.480 da empresa *PerkinElmer* (FIGURA 8). Foi medida também a atividade radioativa da seringa preparada como padrão de dose. A radiação medida pelo contador *Wizard 3* 1.480 foi expressa em contagens por minuto (cpm), como o percentual da dose injetada por grama de baço (% DI/g). Os resultados foram obtidos com a divisão da radiação medida no baço, pelo total medido no padrão de dose e dividindo esse resultado pelo peso médio do baço. O peso médio do baço foi conseguido a partir da pesagem dos baços de 20 ratos com peso e idade semelhantes aos utilizados no estudo.

As carcaças dos animais foram guardadas em congelador exclusivo para descarte de animais do laboratório, por sete dias, para decaimento da atividade radioativa. Em seguida elas foram encaminhadas à divisão de material biológico e hospitalar da Superintendência de Limpeza Urbana (SLU), para serem incineradas.



FIGURA 8: Aparelho contador automático Wizard 3" 1480 do Laboratório de Radioisótopos da Faculdade de Farmácia da UFMG.

6.4 Análise estatística

Para o cálculo do tamanho da amostra, foi empregado o *software* Minitab 16.0, para serem desenhadas curvas de poder da amostra para situações com 2, 3, 4, 5 e 6 réplicas. As curvas de potência indicaram a probabilidade de detectarem-se diferenças entre as médias dos efeitos principais, ou seja, a média obtida em cada uma das seis combinações estudadas (três grupos: controle, baço, baço e estômago, nos dois tempos: 30 e 90 minutos).

Usou-se como estimativa de erro padrão da média dos resultados a serem obtidos o valor de $15 \mu\text{Ci}$. Observa-se, pelos dados da TABELA 1 e do GRÁFICO 1, que cinco réplicas estabelecem probabilidade acima de 97% de detectar diferença de $30 \mu\text{Ci}$, o que representa em torno de 15% de variação em relação à quantidade inicialmente injetada ($200 \mu\text{Ci}$), com nível de significância de 5%.

Optou-se por trabalhar com cinco réplicas e, conseqüentemente, 30 observações.

TABELA 1: Cálculo amostral do números de ratos estudados em cada grupo.

Réplicas	Total de observações	Probabilidade de detecção de diferença de 30 μCi
2	12	48,6%
3	18	78,3%
4	24	91,8%
5	30	97,1%
6	36	99,1%

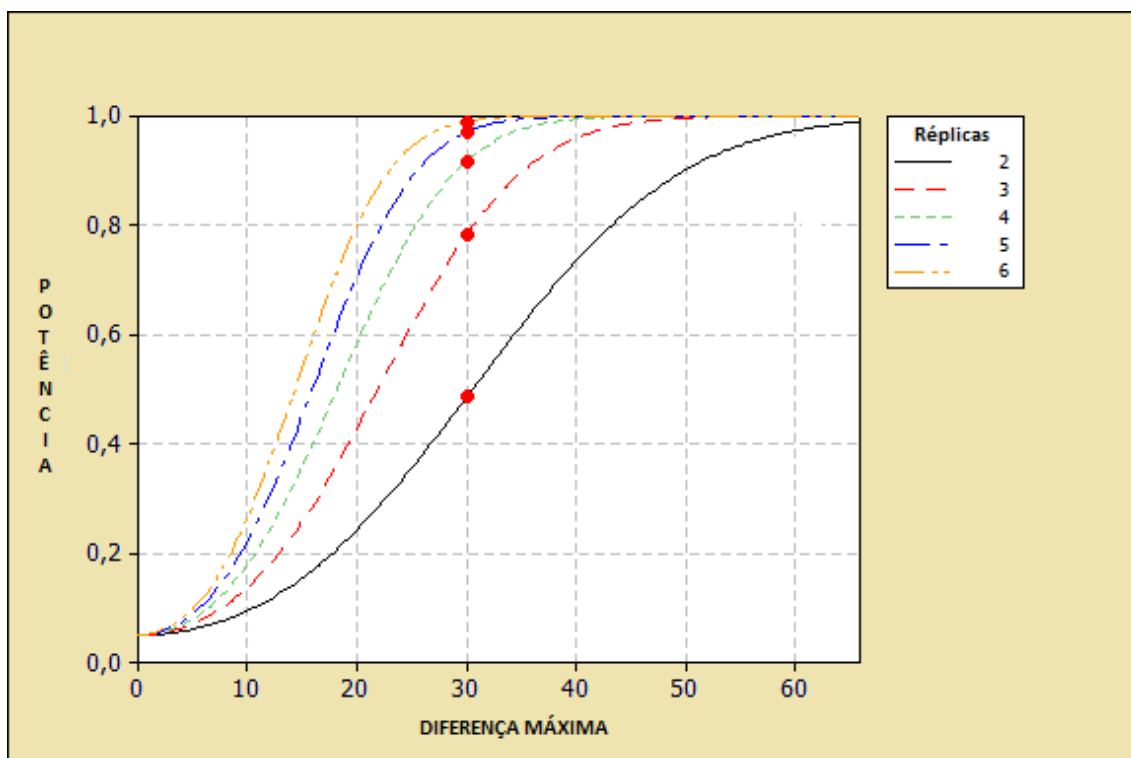


GRÁFICO 1: Curva de potência

Para avaliar a existência de relação entre o peso dos baços e o peso dos animais, utilizou-se o coeficiente de correlação de Spearman, haja vista que a medida foi realizada em 20 ratos e o coeficiente adequa-se a situações em que a amostra é inferior a 30 casos. Para comparar os pesos dos ratos, foi aplicado o teste de Mann Whitney.

Os dados foram apresentados como média, erro padrão da média, valores mínimo e máximo.

Neste estudo foram realizados três procedimentos cirúrgicos e avaliações em dois tempos (30 e 90 minutos), portanto, foram seis combinações e para cada combinação foram obtidas cinco réplicas. Configurou-se, assim, um experimento fatorial e a análise se deram por meio de um modelo linear generalizado. Nessa análise, verificou-se a existência de efeito principal relacionado aos procedimentos cirúrgicos (grupos controle, baço, baço e estômago) e os tempos na variável percentual da dose injetada por grama (%DI/g), além da variável pertecnetato de sódio injetado. Avaliou-se também a existência de efeito da interação entre o tipo de procedimento e o tempo. Considerou-se que valores correspondentes ao nível de $p < 0,05$ indicaram diferença entre os grupos, nas variáveis estudadas.

7. RESULTADOS

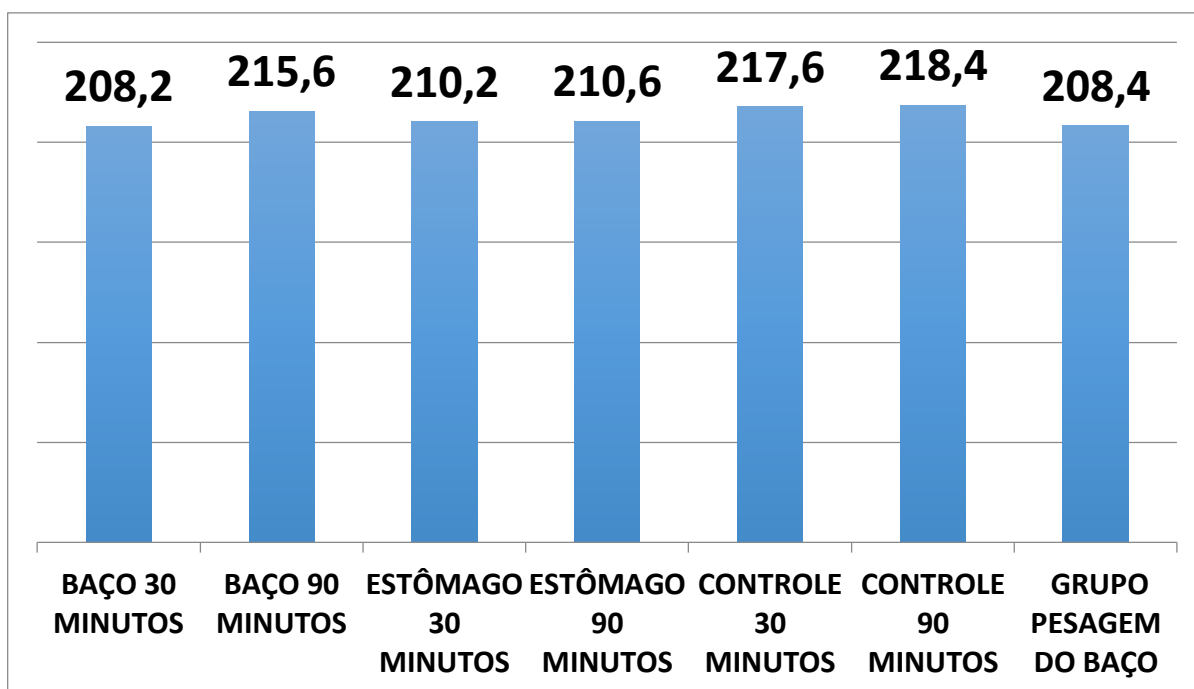
7.1 Considerações gerais

Todos os animais toleraram bem a anestesia, evoluindo sem intercorrências durante o tempo de estudo para cada grupo.

7.2 Peso dos animais e peso médio do baço

Em 20 ratos, a relação entre os pesos dos baços e dos ratos indicou o coeficiente de correlação de Spearman de 0,142. Como o valor p encontrado foi de 0,549, a hipótese nula não deve ser rejeitada, ou seja, a correlação não foi diferente de zero.

O valor de p encontrado na comparação entre os pesos foi de 0,106, indicando a inexistência de diferença entre os pesos da amostra de 20 ratos e a amostra geral de 30 ratos (GRÁFICO 2).



$p = 0,106$.

GRÁFICO 2: Média dos pesos (g) dos animais nos diferentes grupos estudados.

O peso médio encontrado para o baço, utilizado no cálculo do percentual de radiação injetada por grama foi de 0,558 g. As TABELAS 1A e 2A (dos APÊNDICES) mostram os valores individuais obtidos durante as pesagens dos animais.

7.3 Pertecnetato de sódio injetado e percentual de dose injetada por grama de baço (%DI/g)

Não foi encontrada diferença entre os grupos na quantidade de pertecnetato de sódio injetado, nem em relação ao percentual da dose injetada por grama (% DI/g), ou nos tempos de estudo (30 e 90 minutos) (TABELA 2, GRÁFICOS 3 e 4).

TABELA 2: Valores p para as variáveis %DI/g e pertecnetato de sódio injetado, pelo modelo linear generalizado.

Parâmetros	%DI/g	INJETADO
Tipo de operação	0,990	0,722
Tempo (30 ou 60 minutos)	0,166	0,636
Tipo de operação + tempo	0,991	0,672

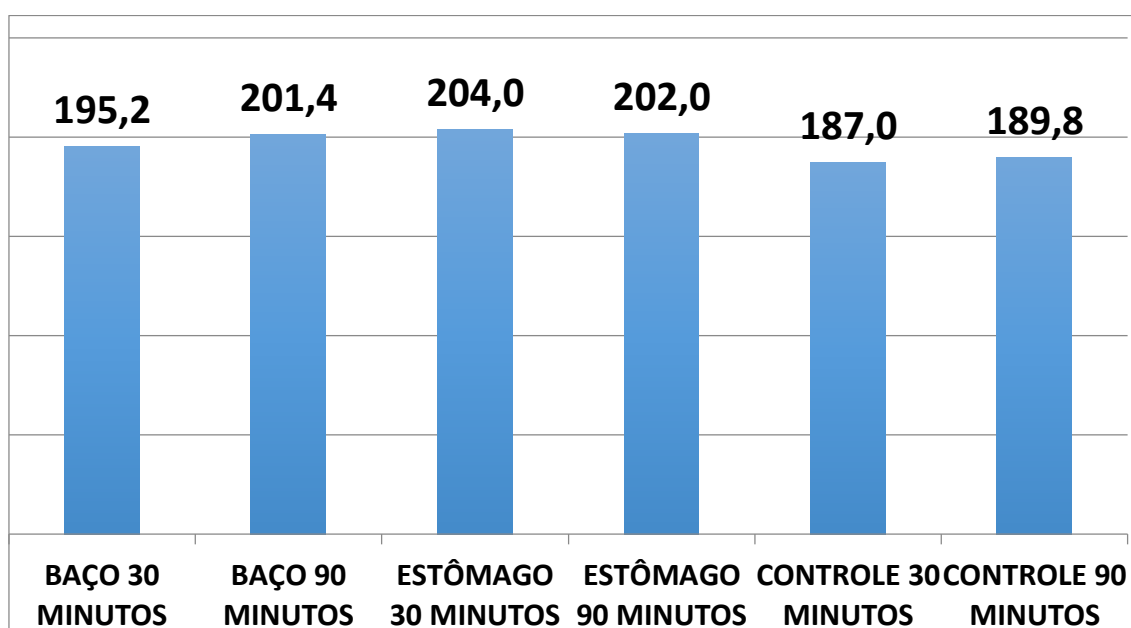


GRÁFICO 3: Valores médios do pertecnetato de sódio injetado (μCi) a cada grupo estudado.

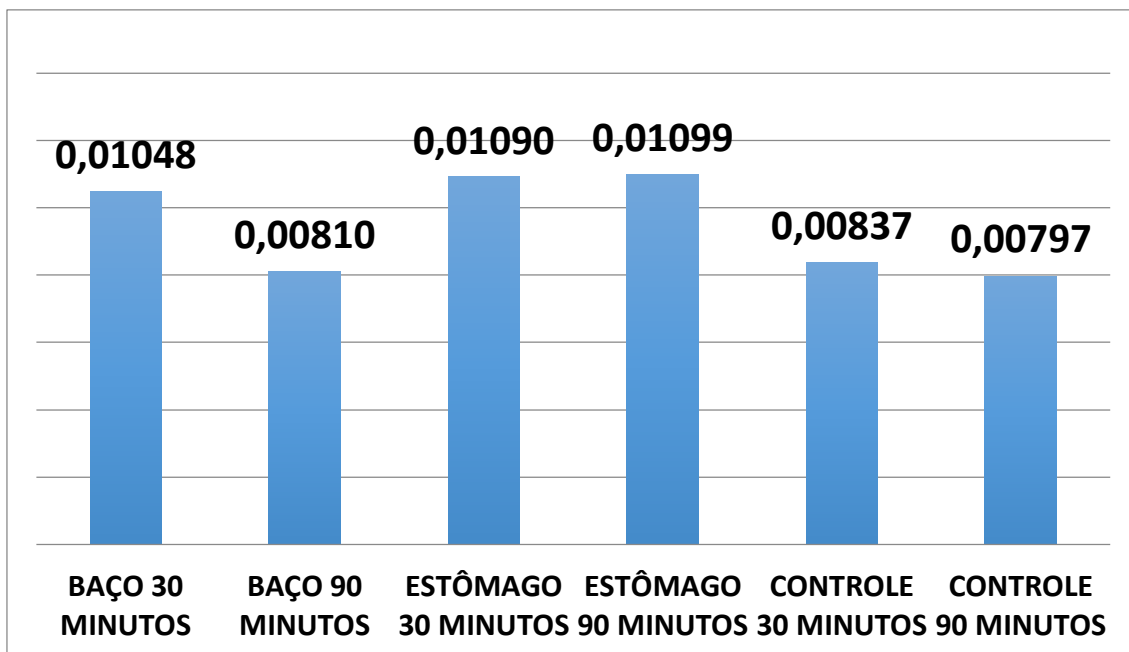


GRÁFICO 4: Valores médios do percentual da dose injetada por grama de baço (%DI/g), nos grupos estudados.

As TABELAS 3A e 4A mostram os valores de pertecnetato de sódio injetado em cada rato e os valores obtidos na contagem da radiação de cada baço, com seus respectivos valores do padrão de dose.

7.4 Imagens cintilográficas

As imagens cintilográficas obtidas neste estudo revelaram qualitativamente a captação do fármaco radioativo pela região do baço e do estômago. A comparação das imagens obtidas nos diferentes tempos de estudo indicou que houve diminuição da atividade radioativa na região central toracoabdominal após 90 minutos, com manutenção da captação do radioisótopo na área de estômago e baço. As imagens correspondem principalmente ao estômago, devido à sua afinidade pelo pertecnetato de sódio.

A tireoide também captou o radiofármaco, sendo que sua melhor visualização se deu nas imagens obtidas após 90 minutos. As FIGURAS 9, 10 e 11 ilustram as imagens obtidas em ratos após 30 e 90 minutos, com concentração abdominal do radioisótopo na região de baço e estômago, além de captação pela tireoide após 90 minutos. Nesse período, houve distribuição do material radioativo, antes concentrado na região toracoabdominal, com permanência no estômago e glândula tireoide, ambos bem contrastados. Mesmo no grupo em que foram ligados a artéria gástrica esquerda e os vasos esplenogástricos, houve concentração do radiofármaco na região gástrica, indicando que a irrigação proveniente do tórax e esôfago conduziu o pertecnetato de sódio ao estômago.

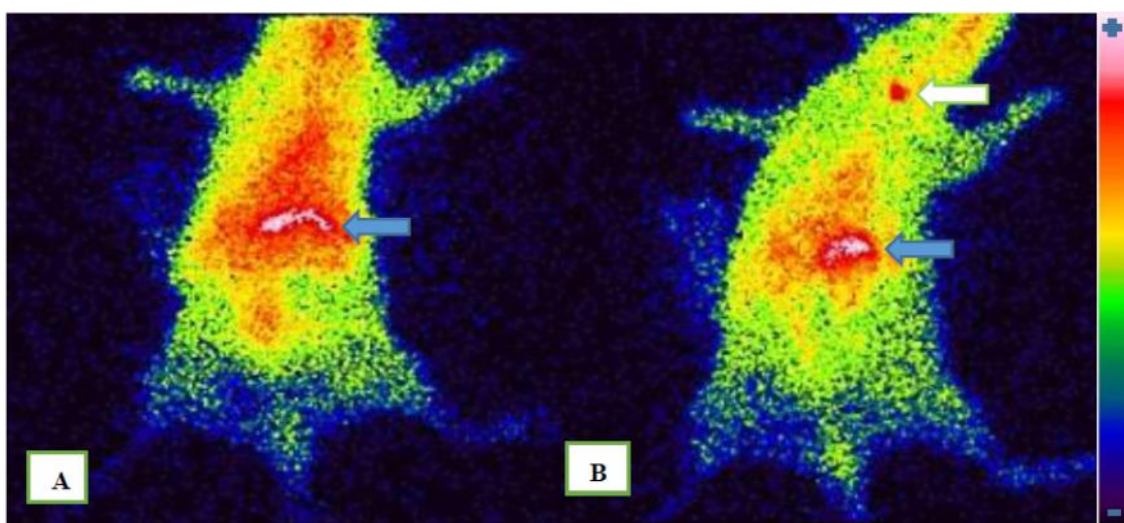


FIGURA 9: Cintilografia do rato 2 do grupo baço - 90 minutos

A: Imagem obtida após 20 minutos da injeção do pertecnetato de sódio, com concentração do radioisótopo na região do baço e estômago (seta azul).

B: Imagem obtida após 90 minutos da injeção do pertecnetato, com concentração do radioisótopo na região de baço e estômago (seta azul) e captação pela glândula tireoide (seta branca). Diminuição da atividade radioativa na região central toracoabdominal.

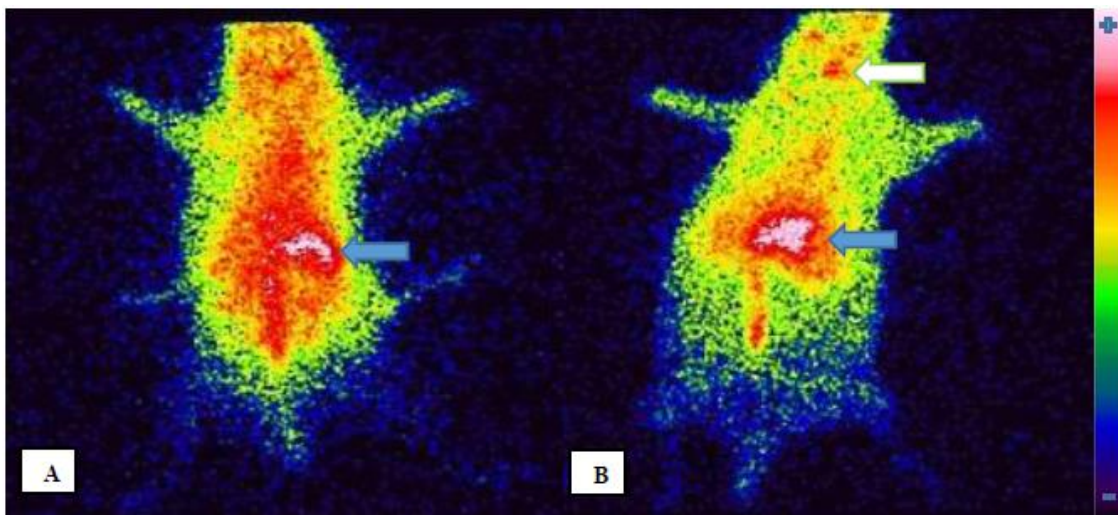


FIGURA 10: Imagem obtida em ratos dos grupos estômago e baço (30 e 90 minutos)

A: Imagem do rato 1 do grupo estômago e baço – 30 minutos, após 20 minutos de injeção do pertecnetato de sódio, com maior concentração de radioisótopo na região abdominal (estômago e baço – seta azul).

B: Imagem do rato 2 do grupo baço e estômago – 90 minutos, após 90 minutos decorridos da injeção de radioisótopo, mostrando captação na região abdominal (estômago e baço - seta azul) e também pela glândula tireoide (seta branca). Diminuição da atividade radioativa na região central toracoabdominal.

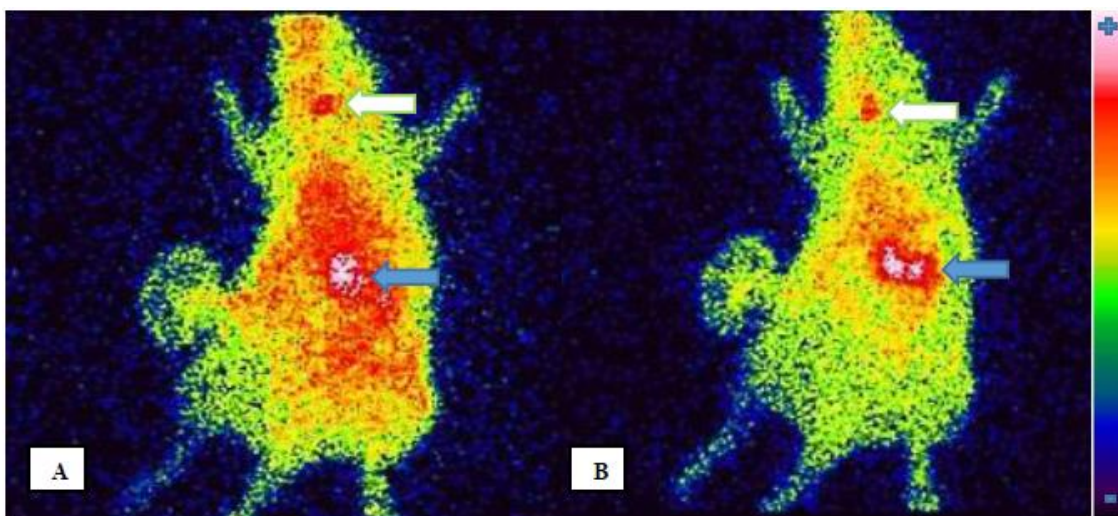


FIGURA 11: Imagem obtida no rato 3 do grupo controle - 90 minutos. Em ambas há a captação do radioisótopo na região abdominal (estômago e baço – setas azuis) e pela glândula tireoide (setas brancas).

A: após 20 minutos da injeção do radioisótopo.

B: após 90 minutos da injeção do radioisótopo. Diminuição da atividade radioativa na região central toracoabdominal.

8. DISCUSSÃO

Este trabalho faz parte de uma linha de pesquisa sobre o baço. Sua relevância deve-se ao fato de ainda não se conhecer o trajeto da circulação vasculoparenquimatosa desse órgão. Os estudos sobre a anatomia e operações esplênicas utilizaram achados de animais, mesclados ao de humanos (PETROIANU, 2003,1993; MARQUES; PETROIANU; COELHO, 2003; MARQUES & PETROIANU, 2003; PETROIANU & BERINDOAGUE NETO, 2006; PETROIANU *et al.*, 2010,2008,2006,2004; ALBERTI *et al.*, 2012,2007; CALDEIRA *et al.*,2005; REZENDE *et al.*,2007; MARQUES *et al.*, 2004,2002; STEINIGER *et al.*, 1997). Ainda que haja diferença na anatomia e fisiologia do baço entre as espécies, os conhecimentos adquiridos em estudos com animais podem auxiliar em pesquisas nos humanos.

8.1 Animais e material

O rato foi escolhido para este estudo devido ao seu tamanho, facilidade de manuseio e disponibilidade. A gamacâmara e o contador automático de radiação gama utilizados foram compatíveis com o tamanho dos ratos e de seus baços.

A escolha de animais adultos foi fundamentada em dados que mostraram diferença entre as funções do baço na idade adulta e nos extremos etários, considerando que alterações anatômicas e na circulação poderiam ocorrer também durante a vida dos animais (PETROIANU, 1993). Foram utilizadas apenas fêmeas, com o intuito de padronizar os grupos.

Existem trabalhos na literatura que utilizam o rato, tanto em estudos experimentais no baço quanto com radioisótopos, evidenciando que o modelo é adequado a esta investigação. Steiniger *et al.* (1997), encontraram diferenças anatômicas entre os baços de humanos e de ratos, descrevendo variações estruturais e na composição celular das polpas branca, vermelha e zona perifolicular. Há diferenças na atividade celular mesmo entre os compartimentos de um único órgão. Matsuno, Fujii e Kotani (1986) ressaltaram que, em ratos, os macrófagos da polpa vermelha esplênica exibiam atividade fagocitária intensa para partículas de carbono, enquanto os macrófagos da zona perifolicular apresentavam atividade fagocitária diminuída para as mesmas partículas, sendo, entretanto, responsáveis pela fagocitose de polissacárides. O esclarecimento da circulação intraparenquimatosa pode ajudar no entendimento das funções e da dinâmica celular no interior do baço.

Outros estudos que utilizaram radioisótopos e aparelhos contadores de radiação, como os desta pesquisa expressaram seus resultados em percentual da dose injetada por grama (%DI/g) do órgão ou tecido avaliado (ARAUJO-FILHO *et al.*,2007; CHACON *et al.*,2007). Neste trabalho foi calculado o peso médio do baço de um grupo de 20 ratos com peso corporal comparável aos utilizados nos grupos de estudo. A pouca variação no peso dos baços e os testes estatísticos confirmaram que a medida do peso médio poderia ser utilizada para esse cálculo, sem prejuízo do resultado final. A comparação entre os pesos dos ratos nos diversos grupos estudados revelou homogeneidade de toda a amostra.

8.2 Ato anestésico e operatório

O tipo de anestesia utilizado nos animais baseou-se em estudos prévios e recomendações do CETEA da UFMG (FLECKNELL, 1993). Os animais toleraram bem os procedimentos cirúrgicos e anestésicos, não tendo havido mortes.

As ligaduras arteriais foram realizadas com o intuito de direcionar o fluxo sanguíneo e do radioisótopo injetado para o baço. Com a injeção do material radioativo no sentido do baço, foi possível avaliar a distribuição inicial (até 30 minutos), tardia (90 minutos) e também a eliminação desse fármaco. Os grupos “estômago e baço” (30 e 90 minutos) tiveram mantidos o fluxo pela artéria gástrica esquerda e pelos vasos esplenogástricos. A manutenção desses vasos poderia influenciar na chegada do radioisótopo ao baço e também na sua eliminação. O fluxo através dos vasos esplenogástricos parece ocorrer principalmente no sentido estômago baço, como já comprovado pela isquemia segmentar do baço, descrita após ligaduras dos vasos esplenogástricos (DRIESSEN *et al.*, 2012; MARTINEZ; SANCHEZ; GARCIA, 2008). A injeção do pertecnetato de sódio diretamente na artéria esplênica não foi possível no rato, devido ao pequeno calibre desse vaso.

Os valores das doses de pertecnetato injetado não tiveram diferença, quando comparados, salientando que os grupos foram homogêneos em relação à radiação administrada. A dose utilizada de 200 μCi , equivalente a 7,4 MBq, já foi utilizada em outros estudos com ratos, tendo sido adequada para esse modelo animal (SENNA-FERNANDES *et al.*, 2009; VALENCA *et al.*, 2005).

8.3 Resultados do estudo e microcirculação esplênica

Não foi encontrada diferença na quantidade de radiação presente no baço quando comparados os tipos de operação, inclusive nos grupos controle, nos quais foi mantida toda a circulação esplênica. Uma possível explicação pode ser que o pertecnetato de sódio-99mTc circulou pelos demais órgãos, ficando retido ao chegar ao baço. Estudo experimental que avaliou a biodistribuição de pertecnetato de sódio por vários órgãos de ratos submetidos à operação de *duodenal switch* indicou captação aumentada pelo baço dos ratos operados, sem, no entanto, ter encontrado as causas para tais achados (ARAUJO-FILHO *et al.*, 2007).

Outro estudo que avaliou a captação de pertecnetato de sódio pelo baço de ratos, após realização de eletroacupuntura em várias frequências obteve maior captação esplênica nos grupos submetidos ao procedimento, quando comparados ao controle (SENNA-FERNANDES *et al.*, 2009). Outra possível explicação é a quantidade de pertecnetato de sódio injetada, que pode ter sido suficiente para impregnar o baço, mesmo no grupo em que o fluxo não foi direcionado a esse órgão. Uma limitação das técnicas operatórias empregadas é o fato de que os ramos torácicos da aorta não puderam ser ligados, assim como os ramos posteriores e as artérias lombares, não se conseguindo o fluxo exclusivo para o baço.

A comparação da radiação contida no baço, nos tempos diferentes (30 e 90 minutos) entre os grupos submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico, também não mostrou diferença, indicando não ter havido eliminação do radiofármaco contido no baço. Esse achado é compatível com a hipótese de que

a circulação vasculoparenquimatosa não eflui imediatamente do baço, mas depende de fatores ainda desconhecidos.

A circulação predominantemente aberta do baço pode explicar essa retenção do sangue no parênquima esplênico. A maioria dos estudos na microcirculação esplênica utiliza a injeção de materiais que, ao se distribuírem pelos vasos do parênquima esplênico, revelam o trajeto seguido. Robinson (1926) injetou óleos, betume diluído em terebintina, pigmentos e gelatinas para tentar delinear a vascularização no interior do baço de cães. Esse autor considerou gelatina com corante o melhor material e identificou a saída dessa gelatina pelos elipsoides, com distribuição em todas as direções na polpa vermelha antes de alcançar a circulação venosa, reforçando o predomínio da circulação esplênica do tipo aberta.

Chen (1978) injetou microesferas plásticas para estudar a circulação esplênica de coelhos e observou que os dois tipos de circulação coexistiam no baço, com 90% do sangue passando pela circulação aberta. Alexandre-Pires, Pais e Esperança Pina (2003) verificaram ambos os tipos de circulação (aberta e fechada) em baços de cães estudados por microscopia eletrônica. Outros achados trouxeram mais questionamentos sobre a microcirculação esplênica, como a presença de “fissuras” intraendoteliais, que permitem a saída de elementos dos sinusoides em direção à polpa vermelha e teorias de que os cordões e espaços na polpas vermelha não sejam extravasculares, mas espaços e cordões endoteliais (WEISS, 1974).

Neste estudo, o pertecnetato de sódio foi escolhido por não ser um coloide radiomarcado ou de material com partículas antigênicas. O baço remove tais marcadores por meio de sua função fagocitária. Ao contrário do que é observado

no estômago e tireoide, não é descrita afinidade específica do baço pelo pertecnetato de sódio. Este modelo estudou a circulação esplênica, por meio de substância que circula como solução aquosa, sem partículas ou características que promovam sua retenção em células esplênicas. Portanto o fluxo é vasculoparenquimatoso

É possível que haja afinidade do baço pelo radiofármaco utilizado e que sua retenção se dê por mecanismo ainda desconhecido. Porém, a afinidade e o emprego desse radioisótopo em cintilografia são estabelecidos. O mecanismo de captação do pertecnetato é a formação do ânion $^{99m}\text{TcO}_4$, que é captado pela *sodium-iodide symporter* (NIS) – uma glicoproteína transmembrana que transporta ativamente ânions para o interior das células (como as células foliculares na tireoide) (BOSCHI *et al.*, 2013). Os órgãos com maior expressão dessa glicoproteína são tireoide, estômago e glândulas salivares. Pesquisa com camundongos mostrou baixa captação e decaimento rápido do pertecnetato no baço, sendo que a hipótese para tais achados é a baixa expressão da NIS nesse órgão (ZUCKIER *et al.*, 2004). A baixa expressão da NIS pelo baço pode reforçar a hipótese de retenção por mecanismos circulatórios formulada nesta investigação.

Em relação às imagens cintilográficas obtidas, foi efetuada apenas análise qualitativa. Optou-se pela não realização de análise quantitativa, por meio de seleção de regiões de interesse (*regions of interest- ROI*), devido ao estômago ser ávido pelo pertecnetato de sódio e seu acúmulo nesse órgão poder ser interpretado como uma falsa retenção no baço, devido à proximidade desses dois órgãos. Mesmo nos grupos em que foi feita a ligadura da artéria gástrica esquerda e dos vasos esplenogástricos, o estômago foi contrastado pelo

pertecnato, chegando ao estômago provavelmente por anastomoses entre ramos arteriais, que nutrem o esôfago distal e o estômago, e mesmo por irrigação submucosa vinda do esôfago. Além disso, a contagem direta da radiação no órgão após a esplenectomia foi considerada mais acurada na avaliação final. As imagens encontradas que mostram acúmulo da radiação na região do estômago e da glândula tireoide estão em concordância com o descrito na literatura, mas considerou-se também a possibilidade do acúmulo na região abdominal corresponder a imagens do baço e estômago sobrepostas, haja vista que o órgão manteve-se com atividade radioativa, mesmo ao final dos 90 minutos.

Apesar de os achados deste trabalho terem fornecido informação sobre a retenção do pertecnato de sódio no interior do baço durante sua circulação, ainda faltam respostas quanto à formação e eliminação do efluente venoso. Pesquisas poderão ser desenvolvidas na tentativa de entender a circulação intraparenquimatosa e a dinâmica da movimentação celular no interior do baço, com especial atenção à formação desse efluente venoso e aos fatores que o influenciam. Outra limitação deste estudo, relaciona-se às alterações na homeostase decorrentes das ligaduras arteriais, que poderiam alterar os resultados. No entanto, entende-se que no grupo controle a agressão foi menor, haja vista que a hipoperfusão foi provocada apenas pela ligadura da aorta acima de sua bifurcação das ilíacas, e que o mesmo padrão de retenção do radioisótopo pelo baço foi encontrado. Cabe ainda compreender a inter-relação entre as microcirculações esplênica e gástrica, que possam explicar o acúmulo do radiofármaco no estômago ao ser injetado para o baço.

9. CONCLUSÃO

O fluxo sanguíneo através do baço não é contínuo. O sangue difunde-se pelo parênquima esplênico e sua drenagem venosa não é imediata, não ocorrendo em período previsível.

10. BIBLIOGRAFIA

- Alberti LR, Rocha RF, Caldeira DAM, Petroianu A. Análise de sobrevivência relacionada ao sexo após esplenectomia, em modelo animal. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2007;29:108-11.
- Alberti LR, Veloso DFM, Vasconcellos LS, Petroianu A. Is there a relationship between lipids metabolism and splenic surgeries? *Acta Cir Bras.* 2012;27:751-6.
- Alexandre-Pires G, Pais D, Esperança Pina JA. Intermediary spleen microvasculature in *Canis familiaris* – morphological evidences of a closed and open type. *Anat Histol Embryol.* 2003;32:263-70.
- Araujo-Filho I, Rêgo ACM, Brandão-Neto J, Villarim-Neto A, Egito EST, Azevedo IM, Medeiros AC. Biodistribution of the radiopharmaceutical sodium pertechnetate after biliopancreatic bypass with duodenal switch. *Braz Arch Biol Technol.* 2007;50:189-97.
- Arnon TI, Horton RM, Grigorova IL, Cyster JG. Visualization of splenic marginal zone B-cell shuttling and follicular b-cell egress. *Nature.* 2013;493:684-90.
- Boschi F, Pagliuzzi M, Rossi B, Cecchini MP, Gorgoni G, Salgarello M, Spinelli AE. Small-animal radionuclide luminescence imaging of thyroid and salivary glands with Tc99m-pertechnetate. *J Biomed Opt.* 2013;18: 076005 1-4.
- Caldeira DAM, Rocha RF, Alberti LR, Petroianu A. Influência da esplenectomia na capacidade física em ratos. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2005;27:197-200.
- Chacon DA, Araujo-Filho I, Villarim-Neto A, Rêgo ACM, Azevedo IM, Bernardo-Filho M, Brandão-Neto J, Medeiros AC. Biodistribution of the radiopharmaceutical sodium pertechnetate ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) after massive small bowel resection in rats. *Acta Cir Bras.* 2007;22:430-5.
- Chen LT. Microcirculation of the spleen: an open or closed circulation? *Science.* 1978;201:157-9.
- Cortés JA, Gómez Pellico L. Arterial segmentation in the spleen. *Surg Radiol Anat.* 1988;10:323-32.

Diniz SOF, Resende BM, Nunan EA, Simal CJR, Cardoso VN. 99M Technetium labelled Escherichia coli. *Appl Radiat Isot.* 1999;51:33-6.

Driessen C, Paulus GF, Robben SG, Tjon A, Tem WE, Van der Neucker A, Verhoeven BH, Van Heurn LWE. Splenic size after division of the short gastric vessels in Nissen fundoplication in children. *Pediatr Surg Int.* 2012;28:235-8.

Ehrlich CP, Papanicolaou N, Treves S, Hurwitz RA, Richards P. Splenic scintigraphy using Tc-99m-labeled heat-denatured red blood cells in pediatric patients: concise communication. *J Nucl Med.* 1982;23:209-13.

Ekeh AP, Khalaf S, Ilyas S, Kauffman S, Walusimbi M, McCarthy MC. Complications arising from splenic artery embolization: a review of na 11-year experience. *Am J Surg.* 2013;205:250-4.

Elmore, SA. Enhanced histopathology of the spleen. *Toxicol Pathol.* 2006;34:648-55.

Flecknell PA. Anaesthesia of animals for biomedical research. *Br J Anaesth.* 1993;71:885-94.

Gupta CD, Gupta SC, Arora AK, Singh PJ. Vascular segments in human spleen. *J Anat.* 1976;121:613-6.

Marques RG, Morales MM, Petroianu A. Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cir Bras.* 2009;24:69-74.

Marques RG, Petroianu A, Coelho JMCO. Bacterial phagocytosis by macrophage of autogenous splenic implant. *Braz J Biol.* 2003;63:491-5.

Marques RG, Petroianu A. Distribuição de Escherichia coli nos órgãos do sistema mononuclear fagocitário após esplenectomia total isolada ou combinada com auto-implante esplênico em rato. *Rev Col Bras Cir.* 2003;30:330-6.

Marques RG, Petroianu A, Oliveira MBN, Bernardo Filho M, Boasquevisque EM, Portela MC. Bacterial clearance after total splenectomy and splenic autotransplantation in rats. *Appl Radiat Isot.* 2002;57:767-71.

- Marques RG, Petroianu A, Oliveira MBN, Bernardo Filho M, Portela MC. Evaluation of possible failure of the mononuclear phagocyte system after total splenectomy in rats. *Braz Arch Biol Technol.* 2004;47:199-204.
- Martinez DG, Sanchez AW, Garcia AP. Splenic abscess after laparoscopic Nissen fundoplication: a consequence of short gastric vessels division. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2008;18:82-5.
- Matsuno K, Fujii H, Kotani M. Splenic marginal-zone macrophages and marginal metallophils in rats and mice. *Cell Tissue Res.* 1986; 246:263-9.
- Menth M, Herrmann K, Haug A, Raziorrouh B, Zachoval R, Jung CM, Otto C. Intra-hepatic splenosis as an unexpected cause of a focal liver lesion in a patient with hepatitis C and liver cirrhosis: a case report. *Cases Journal.* 2009;2:8335.
- Petroianu A. Avaliação da função fagocitária em remanescentes de esplenectomia subtotal e auto-implante esplênico autógeno. *Rev Bras Hematol Hemoter.* 2003;25:25-30.
- Petroianu A, Berindoague Neto R. Esplenectomia subtotal por via laparoscópica em cães. *Rev Col Bras Cir.* 2006;33:305-10.
- Petroianu A, da Silva RG, Nascimento Cardoso V, Alberti LR, da Silva MG. Effect of spleen surgeries on *Escherichia coli* distribution on the mononuclear phagocytic system. *Int J Surg.* 2010;8:48-51.
- Petroianu A. Estudo quantitativo da função fagocitária de macrófagos em baços íntegros e em remanescentes de esplenectomia subtotal, em mamíferos. [Tese de livre docência. Disciplina de Gastroenterologia Cirúrgica – Departamento de Cirurgia, Ortopedia e Traumatologia]. Ribeirão Preto (SP): Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo; 1993.
- Petroianu A, Pereira TC, Oliveira TAN, Barbosa AJA. Avaliação de diferentes métodos de conservação esplênica para tratar lesão cortante do baço. *Rev Col Bras Cir.* 2004;31:364-7.

Petroianu A, Veloso DFM, Alberti LR, Vasconcellos LS. Plasma lipid alterations after total splenectomy, subtotal splenectomy and splenic auto-implants in rats. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008;23:E221-4.

Petroianu A, Veloso DFM, Costa GR, Alberti LR. Efeito de operações sobre o baço no lipidograma de ratas. *Rev Assoc Med Bras*. 2006;52:56-9.

Petroianu A. Pesquisa Experimental. In: Petroianu A – Ética, Moral e Deontologia Médicas. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2000;125-90.

Phom H, Kumar A, Tripathi M, Chandrashekar N, Choudhry VP, Malhotra A, Bal CS. Comparative evaluation of Tc-99m-heat-denatured RBC and Tc-99m-anti-D IgG opsonized RBC spleen planar and SPECT scintigraphy in the detection of accessory spleen in postsplenectomy patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura. *Clin Nucl Med*. 2004;29:403-9.

Rezende AB, Nunes SI, Farias RE, Vieira FR, Petroianu A, Teixeira HC. Influência do baço, da asplenia e do implante esplênico autógeno no metabolismo lipídico de camundongos. *Rev Col Bras Cir*. 2007;24:177-82.

Robinson WL. The vascular mechanism of the spleen. *Am J Pathol*. 1926;2:341-56.

Rollin BE. The regulation of animal research and the emergence of animal ethics. *Theor Med Bioeth*. 2006;27:285-304.

Senna-Fernandes V, França DL, Santos KCM, Sousa RS, Silva D, Cortez CM, Bernardo-Filho M, Guimarães MAM. Effect of zusanli (ST.36) electroacupuncture at two frequencies on the bioavailability on ^{99m}Tc- sodium pertechnetate and on labeling of blood constituents in rats. *J Acupunct Meridian Stud*. 2009;2:135-46.

Skandalakis PN, Colborn GL, Skandalakis LJ, Richardson DD, Mitchell Jr WE, Skandalakis JE. The surgical anatomy of the spleen. *Surg Clin North Am*. 1993;73:747-68.

Skattum J, Loekke RJV, Titze TL, Bechensteen AG, Aaberge IS, Osnes LT, Heier HE, Gaarder C, Naess PA. Preserved function after angioembolisation of

splenic injury in children and adolescents: A case control study. *Injury*. 2012; epub ahead of print.

Steiniger B, Barth P, Herbst B, Hartnell A, Crocker PR. The species-specific structure of microanatomical compartments in the human spleen: strongly sialoadhesin-positive macrophages occur in the perifollicular zone, but not in the marginal zone. *Immunology*. 1997;92:307-16.

Valenca SS, Lima EAC, Dire GF, Bernardo-Filho M, Porto LC. Sodium pertechnetate ($\text{Na}^{99\text{m}}\text{TcO}_4$) biodistribution in mice exposed to cigarette smoke. *BMC Nuclear Medicine*. 2005; 5:1-5.

Weiss L. A scanning electron microscopic study of the spleen. *Blood*. 1974;43:665-91.

Zuckier LS, Dohan O, Li Y, Chang CJ, Carrasco N, Dadachova E. Kinetics of Perrhenate Uptake and Comparative Biodistribution of Perrhenate, Pertechnetate, and Iodide by NIS Symporter–Expressing Tissues In Vivo. *J Nucl Med*. 2004;45:500-7.

11. APÊNDICES

TABELA 1A: Peso de todos os ratos nos grupos estudados.

GRUPOS	PESO (g)				
	Rato 1	Rato 2	Rato 3	Rato 4	Rato 5
Baço 30 min	204	210	222	190	215
Baço 90 min	225	220	213	210	210
Estômago e baço 30 min	222	201	212	205	211
Estômago e baço 90 min	190	224	210	224	205
Controle 30 min	219	208	220	221	220
Controle 90 min	208	220	230	215	219

min = minutos

g = gramas

TABELA 2A: Peso de todos os ratos e seus baços, utilizados para o cálculo do peso médio do baço.

Rato	Peso do animal (g)	Peso do baço(g)
1	203	0,53
2	191	0,50
3	189	0,52
4	213	0,57
5	193	0,62
6	210	0,59
7	207	0,55
8	198	0,60
9	202	0,57
10	201	0,55
11	222	0,54
12	230	0,55
13	210	0,51
14	201	0,56
15	214	0,55
16	216	0,59
17	205	0,53
18	212	0,59
19	226	0,58
20	224	0,56

g = gramas

TABELA 3A: Valores do pertecnetato de sódio injetado em cada rato dos grupos estudados.

GRUPOS	Pertecnetato injetado no rato (μCi)				
	1	2	3	4	5
Baço 30 min	209	171	201	200	195
Baço 90 min	206	205	201	206	189
Estômago e baço 30 min	196	207	209	200	208
Estômago e baço 90 min	198	194	208	206	204
Controle 30 min	195	185	193	177	185
Controle 90 min	197	199	184	183	186

min = minutos

μCi = microCurie

TABELA 4A: Valores de radiação medidos no baço e seus respectivos padrões de dose, nos ratos dos grupos estudados.

GRUPOS		RATO				
		1	2	3	4	5
Baço 30 min	Contagem baço (cpm)	212.395	1.042.753	3.315.533	720.652	1.453.136
	Padrão de dose (cpm)	229372800	229372800	229372800	229372800	229372800
Baço 90 min	Contagem baço	1.429.584	451.474	1.104.329	794.141	1.027.040
	Padrão de dose (cpm)	196710500	196710500	207686500	207686500	263141100
Estômago e baço 30 min	Contagem baço (cpm)	1.408.555	726.139	1.222.880	1.562.223	1.296.549
	Padrão de dose (cpm)	218059300	218059300	197846200	197846200	197846200
Estômago e baço 90 min	Contagem baço (cpm)	949.929	1.981.638	895.557	1.278.706	1.229.307
	Padrão de dose (cpm)	218059300	218059300	197846200	197846200	197846200
Controle 30 min	Contagem baço (cpm)	1.779.887	529.082	1.417.542	617.997	718.151
	Padrão de dose (cpm)	196710500	263141100	196710500	263141100	263141100
Controle 90 min	Contagem baço (cpm)	1.288.814	819.689	784.180	1.072.472	1.324.161
	Padrão de dose (cpm)	207686500	207686500	263141100	263141100	263141100

min = minutos

cpm = contagens por minuto