

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

MARCELA SOUZA LIMA PAULO

**O EFEITO DA EXPOSIÇÃO À OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA NA
EXPRESSÃO DE KI-67, PCNA E VEGF NO POLO INFERIOR DO
BAÇO DE RATOS SUBMETIDOS À ESPLENECTOMIA SUBTOTAL**

Belo Horizonte
2015

MARCELA SOUZA LIMA PAULO

O EFEITO DA EXPOSIÇÃO À OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA NA EXPRESSÃO DE KI-67, PCNA E VEGF NO POLO INFERIOR DO BAÇO DE RATOS SUBMETIDOS À ESPLENECTOMIA SUBTOTAL

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

Área de concentração: Resposta Inflamatória à Agressão Tecidual

Linha de pesquisa: Resposta Imunológica na Esplenectomia Parcial

Orientador: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes.

Coorientador: Prof. Dr. Danilo Nagib Salomão Paulo.

Coorientadora: Prof^a Dr^a Flávia Imbroisi Valle Errera.

Faculdade de Medicina - UFMG

Belo Horizonte

2015

P331e Paulo, Marcela Souza Lima.
O efeito da exposição à oxigenação hiperbárica na expressão de KI-67, PCNA e VEGF no pólo inferior do Baço de ratos submetidos à Esplenectomia Subtotal [manuscrito]. / Marcela Souza Lima Paulo. - - Belo Horizonte: 2015.
68f.: il.
Orientador (a): Tarcizo Afonso Nunes.
Área de concentração: Resposta Inflamatória à Agressão Tecidual.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Esplenectomia. 2. Oxigenação Hiperbárica. 3. Antígeno KI-67. 4. Antígeno Nuclear de Célula em Proliferação. 5. Fator A de Crescimento do Endotélio Vascular. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Nunes, Tarcizo Afonso. II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III. Título

NLM: WO 16

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Dr. Jaime Arturo Ramírez

Vice-Reitora: Prof^a Dr^a Sandra Regina Goulart Almeida

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Dr. Rodrigo Antônio de Paiva Duarte

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof^a Dr^a Adelina Martha dos Reis

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Vice-Diretor: Prof. Dr. Humberto José Alves

Coordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof^a Dr^a Sandhi Maria Barreto

Subcoordenadora do Centro de Pós-Graduação: Prof^a Dr^a Ana Cristina Côrtes Gama

Chefe do Departamento de Cirurgia: Prof. Dr. Renato Santiago Gomes

Chefe do Departamento de Oftalmologia e Otorrinolaringologia: Prof^a Dr^a Ana Rosa Figueiredo Pimentel

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA

Prof. Dr. José Renan da Cunha Melo (Coordenador)

Prof^a Dr^a Ivana Duval Araújo (Subcoordenadora)

Prof^a Dr^a Maria Isabel T. D. Correia

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof. Dr. Marcio Bittar Nenhemy

Prof. Dr. Marco Aurélio Lana Peixoto

Rep. Discente: José Carlos Souza Vilela

Aos meus pais, Samir e Maria Luiza,
que souberam orientar-me para os melhores caminhos.
São com certeza alicerce na construção de minha vida,
ensinando-me sempre que com educação, coragem, dedicação
e muito trabalho consegue-se chegar às grandes realizações.

Ao meu esposo e amigo, Thiago,
que me apoiou em todo este percurso com amor, carinho e compreensão.

Aos meus irmãos, Felipe e Fernanda,
os quais me dão apoio emocional
para enfrentar os desafios que têm surgido ao longo de minha vida.

HOMENAGEM ESPECIAL

Ao tio e professor Danilo Nagib Salomão Paulo, grande mestre e orientador, pessoa que admiro, respeito e por quem tenho um grande carinho. Obrigada por todos os ensinamentos e palavras de sabedoria.

Ao Professor Tarcizo Afonso Nunes, meu querido orientador, pela confiança e oportunidade de todo o aprendizado adquirido durante o mestrado e doutorado. Sempre atencioso e com palavras de incentivo. Minha profunda admiração.

À tia e doutora, Isabel Cristina Andreatta Lemos Paulo (*in memoriam*), que sempre será um exemplo de ser humano, de profissional e de mestre. Sempre me apoiou e me incentivou à carreira docente e de pesquisa. Em todos os momentos de fraqueza e cansaço, ela foi a minha inspiração para continuar persistindo com coragem e determinação. Onde quer que esteja, estará sempre em meu coração.

À Professora Flávia Imbroisi Valle Errera, que me apoiou em um momento difícil e se disponibilizou a escrever comigo meu projeto de doutorado. Sou muito grata por seus ensinamentos, dedicação e paciência durante toda esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, criador de todas as coisas, meu porto seguro. Senhor, sempre confiei em Ti, e quando desanimava, Tu porém me fortalecias. Por isso, estou aqui.

À Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória (EMESCAM), em especial aos Professores Cláudio Medina, Elisardo Vasquez e Flávio Kataoka, por entenderem a importância da qualificação de seus colaboradores. Liberaram-me das atividades para que eu pudesse cursar as disciplinas na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e realizar estágios em outras Instituições.

Ao meu querido chefe, Prof. Valmin Ramos, por toda a sua compreensão e incentivo para a realização desta tese de doutorado. Profissional e ser humano por quem tenho um grande respeito e admiração.

Ao Professor Luiz Cálice Cintra, do Laboratório de Patologia da EMESCAM, pela colaboração e correção da tese quanto ao método imunohistoquímico utilizado.

Ao Professor Luiz Renato Costa, pela colaboração no armazenamento das minhas amostras no Laboratório de DNA da Polícia Civil.

À Professora Maria Rita Passos, chefe do departamento de Genética e Biologia Evolutiva da Universidade de São Paulo (USP), que me recebeu em seu laboratório para que eu pudesse finalizar as análises do meu experimento.

À Lúcia Pimassoni, professora de Estatística, pelas análises estatísticas.

À Maressa Malini, que mesmo sem me conhecer, não mediu esforços para me ensinar algumas das técnicas que utilizei durante a trajetória do doutorado. Hoje, uma grande amiga.

À Isabela Binotti, do Laboratório LUCCAR do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), por ter sido um anjo amigo nas horas complicadas do experimento, achando sempre uma solução alternativa para as dificuldades. Uma grande companheira de estudo e uma querida amiga.

Às amigas que fiz no Centro de Pesquisa da EMESCAM, Larissa Zane, Ágatha Christina e Josivany Freitas. Obrigada por serem amigas, confidentes, companheiras de estudo, de bancada de laboratório e de muitas risadas e choros.

Às alunas Karina Balestreiro, Kethleen Wandekoken, Ingrid Fortes e Filipy Taifson, por toda a contribuição e compromisso nos procedimentos experimentais deste trabalho.

Às queridas Leticia Bonzoni, Iara Pinto e Karine Lorenzoni, pela contribuição científica e técnica.

Às colegas de pós-graduação, Andréa Borjaili e Fernanda Mendonça, pelo apoio e incentivo para enfrentar os desafios da pós-graduação.

Aos amigos veterinários, Roberta Mendes e Marcos Vinícius, que anestesiaram e cuidaram com carinho de todos os animais do experimento.

Aos meus queridos amigos de trabalho, Roberta Miranda, Luiz Antônio, Luciana do Nascimento, Cristiane Talyuli e Andreia Ribeiro, pelo carinho, palavras de afeto, incentivo, risadas e muitas orações. Em especial ao Luiz Antônio e Magno Gomes, do Laboratório de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa da EMESCAM, que sempre cuidaram com muito carinho dos animais e que contribuíram de forma perseverante para a realização de todo o procedimento experimental. Também sou muito grata à Rose, técnica do Laboratório de Patologia da EMESCAM, pela fixação e corte dos materiais histológicos.

À Mari Rocha, secretária do PPG em Ciências Aplicadas a Cirurgia e a Oftalmologia da Faculdade de Medicina da UFMG, pela qualidade do atendimento, pela paciência e pelo carinho em todos os momentos em que precisei de sua colaboração.

À Empresa Biogen, especialmente à Francis e ao Marcos, que não mediram esforços para me ajudar nas dificuldades e dúvidas encontradas durante a padronização da imuno-histoquímica. Sempre muito atenciosos.

Ao Departamento de Apoio à Pesquisa Clínica e Experimental do Instituto de Desenvolvimento Sustentável e Procedimentos na Área de Saúde (Instituto Solidário) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), pelo suporte financeiro. Este último através dos projetos Casadinho/Procad/CNPq 552672/2011-4, Universal 54693284/2011 e Estágio Técnico-Científico 66575109/2014.

À Aninha, minha segunda mãe, pelo zelo e carinho.

Às minhas avós, Lourdinha e Eva (*in memoriam*), pelas orações.

Aos meus sogros, Abel e Glória, pelo carinho e orações.

À minha família de Belo Horizonte, Tia Zezé, Vanessa, Luiza, Antônio André, Júnia, por terem me recebido com tanto carinho e alegria em sua casa. Minha gratidão por vocês é eterna. E aos meus primos, Lucas Murta e Matheus Nagib, e minha amiga, Fernanda Trindade, por estarem sempre disponíveis em Belo Horizonte nos momentos em que precisei.

A todos os familiares e amigos que de forma direta ou indireta colaboraram para a realização desta tese, meu sincero agradecimento.

Enfim, não poderia deixar de agradecer a todos os animais que participaram do experimento, que doaram suas vidas para contribuir no avanço da ciência e trazer benefício para nossa saúde. A eles o meu respeito e eterna gratidão.

“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis,
as pedras do caminho se tornam montanhas,
os fracassos se transformam em golpes fatais.

Mas, se você tiver grandes sonhos...
seus erros produzirão crescimento,
seus desafios produzirão oportunidades,
seus medos produzirão coragem”.

(Augusto Cury).

RESUMO

Objetivos: avaliar se a oxigenação hiperbárica (OHB) aumenta a proliferação celular por meio da expressão de Ki67 e PCNA e a proliferação vascular por meio da expressão de VEGF no polo inferior do baço, após esplenectomia subtotal. Verificar se há correlação entre o tamanho do polo inferior do baço e a quantidade de células positivas para os marcadores Ki67, PCNA e VEGF. **Método:** quarenta ratos machos *Wistar* pesando $358,9 \pm 34,8$ g foram submetidos à esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior, e distribuídos em dois grupos: grupo A (n=20) - sem oxigenação hiperbárica; grupo B (n=20) - submetidos à oxigenação hiperbárica. Os grupos A e B foram divididos em dois subgrupos de 10 animais cada, de acordo com a época de eutanásia: subgrupo 15 dias e subgrupo 45 dias. Os animais foram pesados no dia da esplenectomia subtotal, no 10º dia e no dia da eutanásia. O polo inferior do baço foi medido quanto ao comprimento, largura e espessura no dia da esplenectomia subtotal e no dia da eutanásia (15º e 45º dias). Após a extirpação, o polo inferior do baço foi pesado e fixado em formalina e processado em parafina para análise imuno-histoquímica utilizando marcadores de proliferação celular (Ki67 e PCNA) e vascular (VEGF). **Resultados:** todos os animais sobreviveram até a eutanásia. Houve aumento de peso dos animais de todos os subgrupos do início para o final do experimento. Em nenhum dos grupos o comprimento, largura e espessura do polo inferior do baço se alteraram. A análise imuno-histoquímica mostrou que no grupo A os animais do subgrupo de 45 dias, sem oxigenação hiperbárica, apresentaram aumento significativo de células positivas para Ki67 em comparação aos do subgrupo de 15 dias ($p=0,001$). Os animais do grupo B exibiram maior imunopositividade de Ki67 que os dos subgrupos sem OHB ($p<0,05$). A expressão de PCNA nos grupos A e B foi maior nos animais do subgrupo de 45 dias quando comparados aos do subgrupo de 15 dias ($p<0,05$). Os animais do subgrupo B15, submetidos à oxigenação hiperbárica, apresentaram maior imunopositividade que os do subgrupo A15, sem OHB ($p=0,0029$). No grupo B, animais com oxigenação hiperbárica, houve correlação significativa entre a largura do polo inferior do baço e a proliferação celular por PCNA no subgrupo B15 ($p=0,048$) e foi observada correlação significativa entre o comprimento do polo inferior do baço e a proliferação celular por PCNA no subgrupo B45. O VEGF não apresentou alteração significativa ($p>0,05$) entre os subgrupos, entretanto, no subgrupo B45, houve correlação significativa entre a expressão de VEGF e o tamanho do polo inferior do baço ($p=0,004$). **Conclusões:** A oxigenação hiperbárica após esplenectomia subtotal aumentou a proliferação celular expressa por Ki67 e PCNA e não aumentou a proliferação vascular expressa por VEGF no polo inferior do baço. Nos animais submetidos à oxigenação hiperbárica, houve relação entre o tamanho do polo inferior do baço e a quantidade de células positivas para PCNA e VEGF, mas essa relação não foi encontrada para o Ki67.

Palavras-chave: Esplenectomia. Oxigenação hiperbárica. Antígeno Ki67. Antígeno Nuclear de Célula em Proliferação. Fator A de Crescimento do Endotélio Vascular.

ABSTRACT

Purpose: To evaluate whether hyperbaric oxygen increases cell proliferation by expression of Ki67 and PCNA and vascular proliferation by expression of VEGF in the inferior pole of the spleen after subtotal splenectomy. To verify whether there is a correlation between the size of the inferior pole of the spleen and the amount of positive cells for the markers Ki67, PCNA and VEGF. **Methods:** Forty male Wistar rats, weighing $358.9\text{g} \pm 34.8$ underwent subtotal splenectomy with the preservation of the inferior pole and divided into two groups: group A (n=20)—without hyperbaric oxygenation; group B (n=20)—submitted to hyperbaric oxygenation. Groups A and B were divided into two subgroups of 10 animals each, according to the time of euthanasia: subgroup of 15 days, subgroup of 45 days. The animals were weighed on the day of subtotal splenectomy, on the 10th day and the day of euthanasia. The inferior pole of the spleen was measured in length, width and thickness on the day of subtotal splenectomy and on the day of euthanasia (15th and 45th days). After removal, the inferior pole of the spleen was weighed and fixed in formalin and processed in paraffin for immunohistochemical analysis using markers of cell proliferation (Ki67 and PCNA) and vascular (VEGF). **Results:** All animals survived until euthanasia. There was an increase animal weight of all subgroups from the beginning to the end of the experiment. The length, width and thickness of the inferior pole of the spleen did not change in either group. Immunohistochemical analysis showed that in group A, the animals from the subgroup of 45 days without hyperbaric oxygen showed a significant increase of Ki67 positive cells compared to subgroup of 15 days ($p=0.001$). The animals in group B showed higher Ki67 immunostaining than the subgroups without HBO ($p<0.05$). The expression of PCNA in groups A and B was greater in animals from the subgroup of 45 days when compared to the subgroup of 15 days ($p<0.05$). The animals of subgroup B15 undergoing hyperbaric oxygenation showed higher immunopositivity than subgroup A15 without HBO ($p=0.0029$). In group B, animals with hyperbaric oxygenation, there was a significant correlation between the width of the inferior pole of the spleen and cell proliferation by PCNA in subgroup B15 ($p=0.048$) and significant correlation was observed between the length of the inferior pole of the spleen and the cell proliferation by PCNA in subgroup B45. VEGF was not significant ($p>0.05$) between the subgroups, however, in the subgroup B45, there was a significant correlation between the expression of VEGF and the size of the inferior pole of the spleen ($p=0.004$). **Conclusions:** The hyperbaric oxygenation after subtotal splenectomy, increased cell proliferation by the expression of Ki67 and PCNA and did not increase vascular proliferation by the expression of VEGF in the inferior pole of the spleen. In animals submitted to hyperbaric oxygenation there was a relationship between the size of the inferior pole of the spleen and the amount of cells positive for PCNA and VEGF, but this relationship was not found for Ki67.

Key words: Splenectomy. Hyperbaric Oxygenation. Ki-67 Antigen. Proliferating Cell Nuclear Antigen. Vascular Endothelial Growth Factor A.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µm	Micrômetro
cc	Coeficiente de correlação
cm	Centímetros
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DAB	Diaminobenzidina-tetra-hidrocloro
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio-padrão
EMESCAM	Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória
ESTPI	Esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior
g	Gramma
G1	<i>Gap1</i>
G2	<i>Gap2</i>
h	Hora
IHQ	Imuno-histoquímica
kg	Quilograma
Ki-67	Antígeno nuclear associado ao ciclo celular
l	Litro
LUCAR	Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins
M	Mitose
MA	Média aritmética
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mmol	Milimol
n	Número de animais
nº	Número
OHB	Oxigenoterapia hiperbárica ou oxigenação hiperbárica
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
pH	Potencial hidrogeniônico
S	Síntese

SBCAL	Sociedade Brasileira em Ciência de Animais de Laboratório
TBST	<i>Tris-Buffered Saline and Tween</i>
ua	Unidade arbitrária
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USA	<i>United States of America</i>
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - Fotomicrografias de cortes histológicos de rim de rato utilizados na IHQ como controle negativo e positivo.....	31
FIGURA 2 - Determinação da intensidade integrada para o marcador imunohistoquímico citoplasmático, VEGF.....	32
FIGURA 3 - Determinação do número de núcleos marcados em reações para a proteína de proliferação celular, Ki-67.....	33
FIGURA 4 - Determinação do número de núcleos marcados em reações para a proteína de proliferação celular, PCNA.....	34
FIGURA 5 - Fotomicrografias com marcações nucleares por Ki-67 em cortes histológicos do polo inferior do baço de ratos.....	39
FIGURA 6 - Fotomicrografias com marcações nucleares por PCNA em cortes histológicos do polo inferior do baço de ratos.....	41
FIGURA 7 - Fotomicrografias com marcações citoplasmáticas por VEGF em cortes histológicos do polo inferior do baço de ratos.....	42

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Distribuição dos ratos em dois grupos de acordo com a exposição ou não à OHB e em quatro subgrupos conforme o dia do pós-operatório em que foi realizada a coleta do espécime do polo inferior do baço (n=40).....	25
TABELA 2 - Anticorpos primários utilizados nas reações de imunohistoquímica com as respectivas diluições e tempo de incubação.....	29
TABELA 3 - Peso (g) dos ratos no pré-operatório, no 10º dia e 15º ou 45º dias do pós-operatório de ESTPI, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica.....	36
TABELA 4 - Comprimento (mm) do polo inferior do baço no momento da ESTPI, no 15º e 45º dias do pós-operatório dos ratos, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica.....	37
TABELA 5 - Largura (mm) do polo inferior do baço no momento da ESTPI, no 15º e 45º dias do pós-operatório dos ratos, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica.....	37
TABELA 6 - Espessura (mm) do polo inferior do baço no momento da ESTPI, no 15º e 45º dias do pós-operatório dos ratos, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica.....	38
TABELA 7 - Expressão de Ki-67 no polo inferior do baço de ratos após ESTPI, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica, nos 15º e 45º dias do pós-operatório.....	39
TABELA 8 - Expressão de PCNA no polo inferior do baço de ratos após ESTPI, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica, nos 15º e 45º dias do pós-operatório.....	40
TABELA 9 - Expressão de VEGF no polo inferior do baço de ratos após ESTPI, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica, nos 15º e 45º dias do pós-operatório.....	42
TABELA 10 - Correlação entre a expressão do Ki-67 e as medidas do polo inferior do baço de ratos após ESTPI, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica, nos 15º e 45º dias do pós-operatório.....	43

TABELA 11 - Correlação entre a expressão do PCNA e as medidas do polo inferior do baço de ratos após ESTPI, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica, nos 15º e 45º dias do pós-operatório.....	44
TABELA 12 - Correlação entre a expressão do VEGF e as medidas do polo inferior do baço de ratos após ESTPI, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica, nos 15º e 45º dias do pós-operatório.....	45
TABELA 13 - Correlação entre a expressão de Ki-67 e PCNA no polo inferior do baço de ratos após ESTPI, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica, nos 15º e 45º dias pós-operatório.....	45

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 OBJETIVOS.....	22
3 RELEVÂNCIA.....	23
4 MÉTODO.....	24
4.1 Considerações éticas.....	24
4.2 Características da amostra e constituição dos grupos de animais.....	24
4.3 Procedimento cirúrgico.....	25
4.4 Oxigenação hiperbárica.....	26
4.5 Coleta dos espécimes do polo inferior do baço e eutanásia.....	27
4.6 Estudo da expressão proteica.....	27
4.6.1 Fixação das amostras esplênicas.....	27
4.6.2 Processamento do material para histologia.....	28
4.6.3 Preparação das lâminas para histologia.....	28
4.6.4 Imuno-histoquímica.....	28
4.6.5 Análise dos marcadores imuno-histoquímicos.....	31
4.7 Variáveis estudadas e testes estatísticos.....	34
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Sobrevida e peso dos animais.....	36
5.2 Medida do polo inferior do baço.....	36
5.3 Imuno-histoquímica.....	38
5.3.1 Expressão de Ki-67.....	38
5.3.2 Expressão de PCNA.....	40
5.3.3 Expressão de VEGF.....	41

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas aprovadas pelo Acordo Ortográfico assinado entre os países que integram a Comunidade de Países de Língua Portuguesa (CPLP), em vigor no Brasil desde 2009. E foi formatado de acordo com a ABNT NBR 14724 de 17.04.2011.

5.4 Correlação entre as medidas do polo inferior do baço e as expressões proteicas.....	43
5.4.1 Antígeno nuclear associado ao ciclo celular (Ki-67).....	43
5.4.2 Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA).....	43
5.4.3 Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF).....	44
5.5 Correlação entre Ki-67 e PCNA.....	45
6 DISCUSSÃO.....	46
7 CONCLUSÕES.....	52
8 REFERÊNCIAS.....	53
9 ANEXOS E APÊNDICE.....	60

1 INTRODUÇÃO

Durante muito tempo acreditou-se que a retirada do baço por causa de trauma abdominal ou outras doenças não provocaria danos graves aos pacientes¹⁻⁴. No entanto, o risco de desenvolvimento de infecção fulminante pós-esplenectomia tanto em crianças⁵⁻⁷ quanto em adultos pode surgir em qualquer época após a operação e independe da indicação cirúrgica^{6,7}. O aumento do índice de infecção em cães e em ratos esplenectomizados sugere correlação entre esplenectomia e sepse⁸⁻¹¹. Além disso, foram verificadas alterações no metabolismo lipídico em seres humanos¹²⁻¹⁴ e em animais de laboratório¹⁵⁻²⁰ após a esplenectomia total.

O baço é um dos principais órgãos do sistema mononuclear fagocitário, pois atua como importante filtro biológico e desempenha papel fundamental no sistema imunitário⁵. Além disso, possui função primordial na depuração de células e bactérias da corrente sanguínea, propicia a produção rápida de anticorpos e atua na ativação de macrófagos e na proliferação de linfócitos^{8,21}.

Uma vez verificadas a relevância e diversidade funcional do baço, sua preservação total ou parcial passou a ser realizada de forma mais frequente^{4,22-33} e as operações conservadoras tornaram-se mais valorizadas. A esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior (ESTPI) é uma das alternativas para manter a função de defesa do organismo³⁰. Diversos estudos experimentais têm mostrado resultados satisfatórios dessa operação^{17,19,30,34-38}, especialmente quando associada à oxigenação hiperbárica (OHB)³⁹⁻⁴¹.

Paulo *et al.* (2011) observaram que o polo inferior do baço nos animais submetidos à OHB nos 15^o e 45^o dias do pós-operatório apresentou, à histologia convencional, mais proliferação celular e mais aumento no número de vasos do que nos animais sem essa terapia⁴¹. Entretanto, esses resultados carecem de avaliação pormenorizada por meio de métodos que permitam quantificar e reconhecer a expressão proteica, bem como localizar moléculas importantes na proliferação celular e vascular do polo inferior do baço.

A proliferação celular é um processo biológico essencial a todos os organismos vivos, devido ao seu papel no crescimento e manutenção da

homeostase dos tecidos⁴², porém esse processo foi avaliado pela observação das figuras de mitose, que representam apenas uma fase do ciclo celular. Com a descoberta de proteínas que desempenham funções importantes e específicas no ciclo celular, outros métodos foram desenvolvidos e possibilitaram a identificação direta de células ciclizantes^{43,44}. Hoje, o método mais comum para determinar a atividade proliferativa são as técnicas de imuno-histoquímica (IHQ), que são cada vez mais aplicadas na patologia de rotina⁴⁵.

O ciclo celular consiste em diversas fases: antes da síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) (G1), síntese de DNA (S), depois da replicação do DNA (G2) e a fase mitótica, que culmina com a divisão celular. Esse ciclo é regulado em dois momentos principais denominados pontos de restrição (*check points*): no período de G2 tardio, antes da entrada da célula em mitose; e na interfase, ao final de G1, no período inicial chamado de *start*^{43,44}. O início do período G1 é controlado por nutrientes, hormônios e fatores de crescimento. As fases do ciclo celular que seguem ao G1 tardio (S, G2 e M) processam-se independentemente de fatores externos⁴³.

Para identificar as células em proliferação, algumas proteínas relacionadas à fase replicativa têm sido utilizadas como marcadores e detectadas com anticorpos monoclonais, sendo o antígeno nuclear associado ao ciclo celular (Ki-67) e o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) os mais utilizados⁴⁶⁻⁴⁸.

O Ki-67, proteína nuclear não histona, é um marcador clássico de proliferação celular amplamente aplicado nas áreas de diagnóstico, de investigação e de descoberta de fármacos⁴⁵. Essa proteína é muito utilizada para avaliar a atividade proliferativa de uma população celular, por associar características desejáveis para esse tipo de marcador, como a expressão durante praticamente todo o ciclo celular, do início da fase G1 a M, e por possuir meia-vida curta, sendo degradada uma hora após a mitose. Sendo assim, mesmo marcações tênues podem ser consideradas positivas⁴⁹⁻⁵² e indicarão que a célula está em processo de divisão ou proliferação.

O PCNA é outra proteína nuclear não histona necessária à síntese de DNA, detectada desde a fase G1 até a transição de G2 a M, atingindo seu máximo na fase S do ciclo celular^{49,53}, estando ausente na fase G0^{49,50}. Pode ser utilizada como marcador de proliferação celular, porque as células permanecem mais tempo na fase G1 e S, quando estão se proliferando⁵³. Essa proteína tem

papel essencial no metabolismo de ácido nucleico como componente da replicação do DNA e mecanismo de reparo^{53,54}. O aumento nos níveis de PCNA pode ser induzido por fatores de crescimento ou como resultado de dano ao DNA na ausência de ciclo celular^{53,55}. O PCNA possui meia-vida longa, fazendo com que as frações proliferativas sejam, muitas vezes, super-representadas^{49,50}.

A proliferação de novos vasos a partir de vasos preexistentes, denominada angiogênese, é fundamental para a funcionalidade e regeneração do tecido esplênico. O papel da angiogênese é fornecer nutrição e oxigênio para os tecidos em crescimento, o que parece proporcionar a condição fisiológica de cicatrização de feridas^{56,57}. O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) é um dos mais importantes fatores pró-angiogênicos⁵⁸. Atua diretamente no endotélio, induz a proliferação e migração de células endoteliais e promove, assim, a vascularização do tecido^{59,60}. O aumento na produção de VEGF ocorre principalmente em condições de hipóxia, que é o principal indutor da produção desse fator⁶¹.

Estudos experimentais mostraram que a OHB apresenta as propriedades seguintes: promove angiogênese⁶²⁻⁶⁴; estimula a circulação colateral⁶⁵; melhora o resultado de transplantes das ilhotas pancreáticas⁶⁶; atenua os efeitos deletérios sobre fígado e baço de ratos submetidos à ligadura das veias hepáticas e reduz a incidência de mortes⁶⁷; induz a expressão de VEGF no fígado⁶⁸; reduz a lesão hepática na regeneração do fígado de ratos após hepatectomia parcial⁶⁸⁻⁷⁰; acelera a cicatrização do baço após a ligadura simultânea da artéria e veia esplênicas⁷¹; melhora a viabilidade do polo inferior do baço após ESTPI⁴¹; e induz expressão de PCNA⁷².

No sentido de avançar os conhecimentos, é importante investigar se a OHB poderá favorecer a proliferação celular e vascular do polo inferior do baço remanescente da esplenectomia subtotal e se esses efeitos poderão variar em função do tempo de recuperação após a OHB. Para dar sustentação a essa investigação, espera-se que as análises de IHQ possam contribuir para compreender os processos celulares que ocorrem durante o crescimento e proliferação do polo inferior do baço, influenciados ou não pela OHB.

2 OBJETIVOS

- a) Avaliar se a oxigenação hiperbárica aumenta a proliferação celular e a proliferação vascular no polo inferior do baço, após esplenectomia subtotal.
- b) Identificar se há correlação entre o tamanho do polo inferior do baço e a quantidade de células positivas para os marcadores de proliferação.

3 RELEVÂNCIA

O propósito da esplenectomia subtotal é preservar tecido esplênico suficiente para manter a função de defesa do organismo; e o da oxigenação hiperbárica é contribuir para aumentar a proliferação celular do remanescente esplênico. Caso isso ocorra, essa modalidade terapêutica poderá ser utilizada para estimular a proliferação celular e vascular, manter importantes funções do baço e reduzir as complicações decorrentes da disfunção esplênica.

A compreensão dos processos celulares que ocorrem durante o crescimento e proliferação do polo inferior do baço poderá contribuir para as decisões clínicas sobre o uso da OHB nas operações conservadoras do baço.

4 MÉTODO

4.1 Considerações éticas

Este é um estudo experimental prospectivo cujo protocolo foi aprovado pelos Comitês de Ética no Uso de Animais da EMESCAM (nº 006/2011 – ANEXO A) e da UFMG (nº. 207/2012 – ANEXO B), seguindo os princípios éticos preconizados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/ Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (SBCAL/COBEA) e pela Lei nº. 11.794/2008 que regulamenta o uso de animais em pesquisa no Brasil.

Os ratos foram adquiridos do Biotério de Produção Animal do Centro de Pesquisa da EMESCAM, sendo o experimento realizado no Laboratório de Experimentação Animal desse Centro. Os animais foram mantidos em ambiente climatizado, com controle de temperatura (20° a 22°C), ventilação, luminosidade (12 horas claro e 12 horas escuro) e receberam ração própria para a espécie (Nuvilab CR-1 autoclavável - Nuvital®) e água à vontade em todas as fases do experimento. Utilizou-se ficha de anotação para acompanhamento individual dos animais.

4.2 Características da amostra e constituição dos grupos de animais

O experimento foi realizado em 40 ratos machos da linhagem *Wistar*, com dois a três meses de idade, peso médio de $358,9 \pm 34,8$ g. Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em dois grupos de acordo com a submissão ou não à OHB e, posteriormente, foram constituídos quatro subgrupos conforme o dia da coleta do espécime do polo inferior do baço para análise IHQ (TAB. 1).

TABELA 1 - Distribuição dos ratos em dois grupos de acordo com a exposição ou não à OHB e em quatro subgrupos conforme o dia do pós-operatório em que foi realizada a coleta do espécime do polo inferior do baço (n=40)

Grupos	Subgrupos	Dia da coleta do espécime	Número de fragmentos de tecido de baço
A - sem oxigenação hiperbárica (n=20)	A15	15º dia	10
	A45	45º dia	10
B - com oxigenação hiperbárica (n=20)	B15	15º dia	10
	B45	45º dia	10

A aleatorização foi feita por meio de envelope opaco e lacrado que continha em seu interior o número do subgrupo. Antes do sorteio, os envelopes foram misturados entre si e um deles sorteado, aberto, identificando o subgrupo a que o animal iria pertencer.

Ao final da composição dos grupos e subgrupos, os animais foram alojados em gaiolas apropriadas (quatro animais por gaiola), devidamente identificadas e mantidas em gabinetes Biotério STD 5 (Grupo *Vidy* - São Paulo, Brasil).

4.3 Procedimento cirúrgico

O cirurgião que executou o procedimento cirúrgico desconhecia o grupo e o subgrupo aos quais os animais pertenciam. Os animais foram pesados (balança eletrônica Filizola® modelo MF-6 – sensibilidade de 1 g), anestesiados com 75 mg/kg de cloridrato de cetamina (Vetaset®, *Fort Dodge* – Iowa, USA) associados a 5 mg/kg de cloridrato de xilazina (Kensol®, *König* – Avellaneda, Argentina) aplicados via intraperitoneal.

Uma vez anestesiados, os ratos foram imobilizados em mesa cirúrgica, identificados com marca na cauda, realizada a tricotomia da parede abdominal e torácica e antissepsia da parede abdominal com solução alcoólica de polivinilpirrolidona-iodo a 10%.

O procedimento cirúrgico consistiu-se em⁴¹:

- a) Incisão longitudinal da pele e tela subcutânea com aproximadamente 2,5 cm de comprimento, que se iniciou 0,5 cm abaixo do processo xifoide;

- b) abertura da linha alba e peritônio;
- c) exploração da cavidade abdominal;
- d) mobilização do baço até a superfície da cavidade abdominal;
- e) ligadura e secção dos vasos que irrigavam a porção superior e média do baço, rente à superfície esplênica, com *mononylon* 6.0 (Shalon®, Shalon Fios Cirúrgicos Limitada - Goiás, Brasil);
- f) secção do baço abaixo dos vasos laqueados, mantendo-se o polo inferior irrigado por vasos no ligamento gastroesplênico e extirpou-se a porção superior do baço;
- g) a área cruenta do polo inferior do baço não foi suturada;
- h) medição do polo inferior do baço na sua parte central, quanto ao comprimento, largura e espessura, empregando-se paquímetro de plástico;
- i) laparorráfia por meio de sutura contínua do peritônio e o plano musculoaponeurótico em conjunto e da pele empregando-se *mononylon* 6.0 (Shalon®, Shalon Fios Cirúrgicos LTDA - Goiás, Brasil).

Ao final da operação, foram administrados 5 mL de solução salina 0,9% via subcutânea e esse procedimento foi repetido a cada 24 horas por dois dias, com finalidade de reposição hidroeletrólítica⁷³.

No período pós-operatório, os animais receberam dipirona sódica (Medley - São Paulo, Brasil) na dose de 52,5 mg/dia, via oral, dissolvido na água do bebedouro (72 horas), dieta livre e água à vontade e cloridrato de nalbufina (Nubain®, Cristália – São Paulo, Brasil) na dose de 0,1 mg/kg a cada 12 horas durante três dias. A evolução dos animais foi registrada em ficha individual.

4.4 Oxigenação hiperbárica

Após o término do efeito da anestesia, os animais do grupo B foram submetidos à OHB em câmara apropriada, conforme protocolo⁷¹: compressão gradual até 2,5 atmosferas (1 atmosfera ao nível do mar e 1,5 atmosfera marcado no manômetro da câmara) pelo período de 15 minutos, sendo mantidos nessa pressão por 90 minutos, seguido da descompressão gradual da câmara por 15 minutos. Esse procedimento foi realizado duas vezes ao dia, com intervalo de três

horas entre as sessões, durante os três primeiros dias; e uma vez ao dia, durante os sete dias seguintes.

Os animais do grupo A foram mantidos dentro da câmara hiperbárica pelo mesmo período utilizado para os animais do grupo B, para simular a oxigenação hiperbárica e submetê-los ao estresse de confinamento.

4.5 Coleta dos espécimes do polo inferior do baço e eutanásia

No 15^o ou 45^o dias do pós-operatório, conforme o subgrupo, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina associado a cloridrato de xilazina aplicados via intraperitoneal e submetidos à nova laparotomia, para coleta do espécime do polo inferior do baço. Em seguida, foi realizada eutanásia dos animais aplicando-se pentobarbital sódico (Hypnol[®], Syntec - São Paulo, Brasil) na dose de 120 mg/kg intraperitoneal e cloreto de potássio 10% intracardíaco (dose-efeito). O polo inferior do baço extirpado foi pesado em balança *Adventurer* OHAUS[®] modelo AR 3130 com precisão de 0,001 g e medido (comprimento, largura, espessura), na sua parte central, do mesmo modo que se fez durante a ESTPI.

4.6 Estudo da expressão proteica

4.6.1 Fixação das amostras esplênicas

As amostras de polo inferior do baço extirpados no 15^o e 45^o dias pós-operatório foram seccionados longitudinalmente e as distintas partes foram fixadas em formalina tamponada neutra 10% (potencial hidrogeniônico - pH 7) por 24 a 48 horas. Todos os procedimentos de IHQ foram realizados no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) do Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES).

4.6.2 Processamento do material para histologia

Decorridas 48 horas de fixação, as amostras identificadas foram alocadas em cassetes histológicos e posteriormente processadas em baterias de desidratação em álcool absoluto (cinco repetições), diafanização em xilol (duas repetições) e inclusão em parafina histológica (duas repetições). Cada banho durou 40 minutos, totalizando seis horas de inclusão dentro de estufa a 60°C. O emblocamento do material foi realizado usando-se moldes histológicos de alumínio (dimensões 15x15x5 mm) e os blocos parafinizados foram armazenados em geladeira até o momento da microtomia.

4.6.3 Preparação das lâminas para histologia

Os cortes histológicos com 2 µm de espessura foram obtidos usando-se micrótomo rotativo manual (*Leica Biosystems*, Germany, 2125RT) e, em seguida, montados em lâminas revestidas com silano (Autofrost® - *CancerDiagnostic*, *United States of America* - USA). As lâminas preparadas foram envolvidas em papel alumínio, armazenadas em caixas histológicas e mantidas no congelador a -20°C até a realização da IHQ.

4.6.4 Imuno-histoquímica

Os cortes histológicos sobre as lâminas foram retirados do congelador e colocados em estufa a 60°C por 12 horas para secagem e desparafinização. Em seguida, as lâminas foram organizadas em acessórios de vidro (bercinhos) para coloração manual, até o momento da recuperação antigênica. Concomitantemente, o tampão citrato 10 mmol/L pH 6,0 (*Spring Bioscience*®) foi aquecido em banho-maria até a temperatura de 95-96°C, onde os bercinhos foram imersos e mantidos por 30 minutos. Após essa etapa de recuperação, o conjunto tampão-lâminas foi retirado do equipamento e mantido à temperatura ambiente para resfriar durante 10 minutos e as lâminas foram lavadas em água deionizada em dois tempos de um minuto cada.

Para a etapa seguinte, procedeu-se à secagem individual de cada lâmina com lenço de papel e demarcação dos cortes histológicos com caneta hidrofóbica (*Sigma-Aldrich*®, USA). Peróxido de hidrogênio 3% foi aplicado sobre os cortes histológicos e as lâminas foram incubadas em câmara úmida por 15 minutos à temperatura ambiente, para bloqueio da peroxidase endógena. Os cortes histológicos foram lavados com tampão *Tris-Buffered Saline and Tween* (TBST) por cinco minutos e depois foram incubados com solução para bloqueio de proteínas endógenas (*Spring Bioscience*®) por 10 minutos e, em seguida, lavados com TBST em dois tempos de três minutos cada.

Os anticorpos primários (Ki-67, PCNA e VEGF) foram diluídos em diluente de anticorpo comercial (*Spring Bioscience*®). Os cortes histológicos foram incubados com os anticorpos primários em câmara úmida à temperatura ambiente, no tempo e diluições (TAB. 2).

TABELA 2 - Anticorpos primários utilizados nas reações de imuno-histoquímica com as respectivas diluições e tempo de incubação

Anticorpo	Fornecedor (nº de catálogo)	Diluição	Tempo de incubação
Ki-67	Abcam - ab 16667	1:25	1h30min
PCNA	Abcam - ab 80576	1:400	1h30min
VEGF	Abcam - ab 1316	1:200	1h

Decorrido o tempo de incubação, os cortes histológicos foram lavados em TBST por três tempos de três minutos cada. Para amplificar a visibilização da reação, foi aplicado sobre os cortes o polímero *N-Histofine*® (Nichirei, Japan) conjugado com peroxidase e as lâminas foram incubadas em câmara úmida à temperatura ambiente por 30 minutos. Os cortes histológicos foram lavados em TBST por três tempos de três minutos cada.

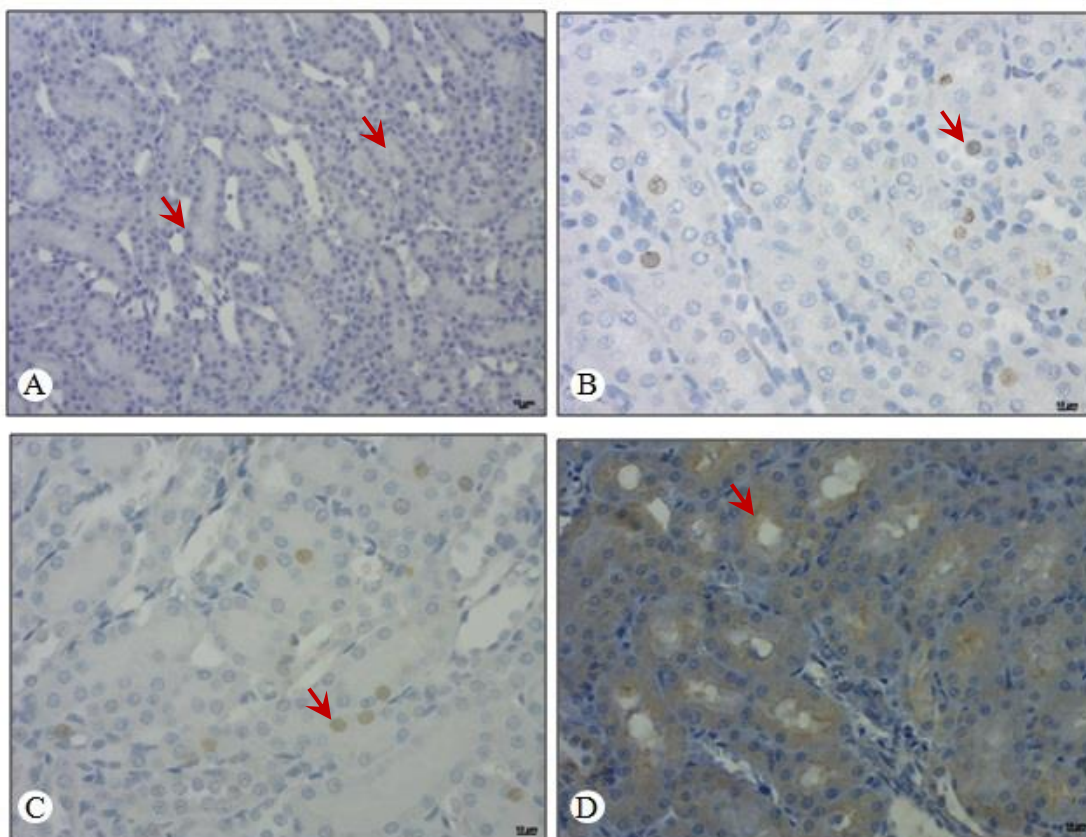
Para revelação da reação foi utilizado o substrato-cromógeno diaminobenzidina-tetra-hidrocloro (DAB líquido - *Spring Bioscience*®) preparado de acordo com as recomendações do fabricante. O DAB diluído foi aplicado sobre os cortes e incubado à temperatura ambiente por 10 minutos. Para retirada do excesso de DAB, os cortes histológicos foram lavados em água corrente por cinco minutos.

Para melhor detecção do marcador proteico, foi realizada a contracoloração, colocando-se as lâminas em cuba contendo hematoxilina de Harris (PA) durante 30 segundos. Ao final da reação, os cortes histológicos foram lavados em água corrente para retirar o excesso de hematoxilina. Na cuba contendo água de torneira com as lâminas contracoradas e lavadas, adicionaram-se 3 a 5 mL de hidróxido de amônia (PA) com contagotas, para tornar a coloração da hematoxilina mais azulada, facilitando a leitura do sinal marrom do DAB. As lâminas foram mergulhadas e erguidas por duas ou três vezes.

Como etapa final do protocolo, os cortes histológicos foram lavados novamente em água corrente e submetidos à desidratação em água destilada por dois tempos de um minuto cada, álcool etílico 50% por dois tempos de um minuto cada, álcool etílico 70% por dois tempos de um minuto cada, álcool etílico 95% por dois tempos de um minuto cada e xilol PA por dois tempos de um minuto cada. A montagem das lâminas foi feita com lamínulas de vidro usando meio não aquoso DPX [p-xylene-bis (N-pyridinium bromide)] (*Sigma-Aldrich*®, USA).

Para controle negativo, o anticorpo primário não foi utilizado, sendo substituído por diluente de anticorpo comercial (*Spring Bioscience*®) e os cortes histológicos de rim de rato foram apenas corados em hematoxilina (coloração azul) (FIG. 1A). Para controle positivo, utilizou-se rim de rato, com marcação por DAB (coloração marrom). Para Ki-67 e PCNA, o padrão de marcação esperado é nuclear (FIG. 1B e 1C), sendo o VEGF citoplasmático (FIG. 1D).

FIGURA 1 - Fotomicrografias de cortes histológicos de rim de rato utilizados na IHQ como controle negativo e controle positivo



Observar no controle negativo núcleos e citoplasma corados apenas em hematoxilina (coloração azul) (A). Observar no controle positivo para Ki-67 (B) e PCNA (C) núcleos marcados por DAB (coloração marrom) e para VEGF (D), citoplasma corado por DAB (coloração marrom). Aumento de 400X.

4.6.5 Análise dos marcadores imuno-histoquímicos

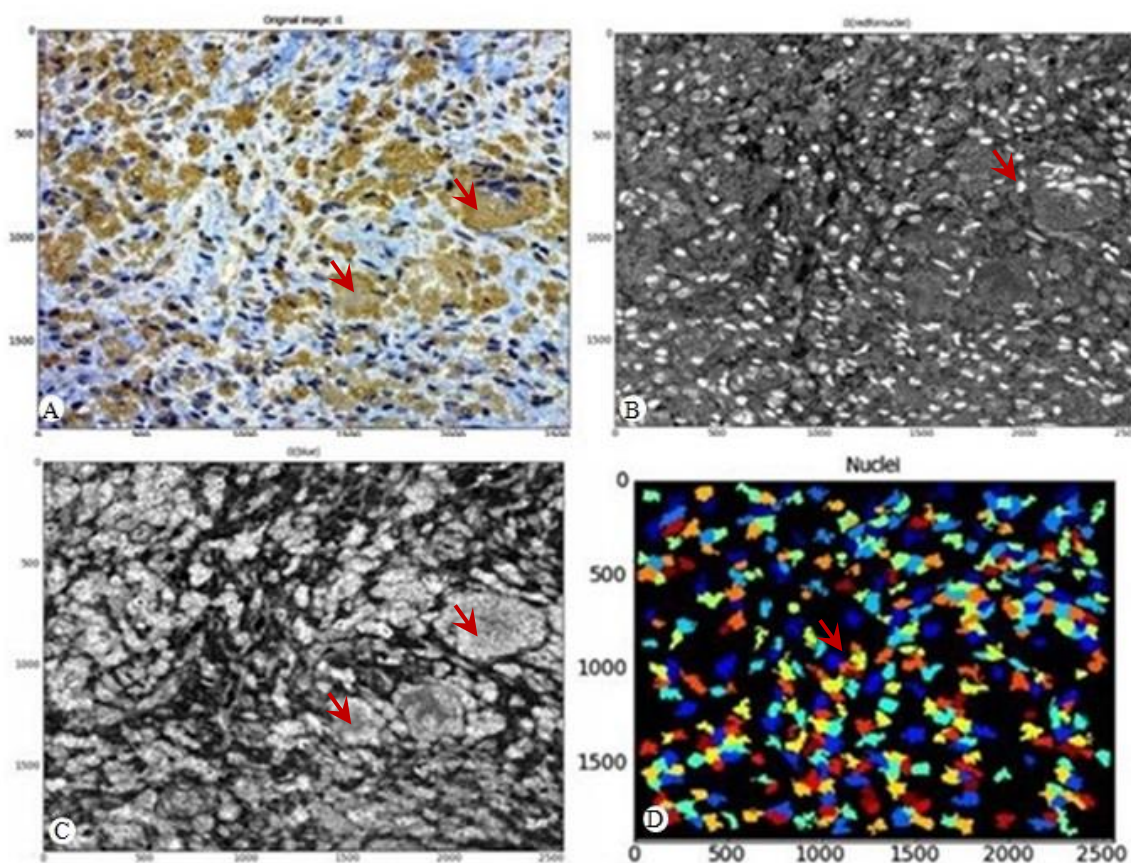
A leitura dos cortes histológicos foi feita em fotomicroscópio Olympus AX70 (*Olympus Corporation, Japan*) com câmera AxioCam ERc 5s (*Carl Zeiss MicroImaging, Germany*) acoplada, em objetiva de 40x com magnificação de 400x, sendo analisados 10 campos não consecutivos por corte.

A cada conjunto de imagens feitas pelo software *AxioVision Imaging System 4.8* (*Carl Zeiss MicroImaging, Germany*), foi realizada a análise da expressão do Ki-67, PCNA e VEGF por meio do programa *CellProfiler Analyst* (*Imaging Platform, Broad Institute of MIT and Harvard, USA*).

Para o VEGF, marcador citoplasmático, foi realizada a determinação por intensidade integrada, medida em pixel/pixel ou unidade arbitrária (ua), que

consiste em somar todas as intensidades em pixel da foto e proceder à quantificação de cada cor, em função da predominância de uma cor sobre a outra. O espectro do corante dos componentes celulares de interesse foi azul para o núcleo (hematoxilina) e marrom para o citoplasma (DAB), com a inversão de cores para escalas de cinza (FIG. 2B e 2C, respectivamente). Assim, mediu-se o quanto cada espectro contribuía para leitura, determinou-se a intensidade final combinada desse conjunto (FIG. 2D) e então foi constituída tabela com os valores finais, em média e desvio-padrão (DP) (FIG. 2).

FIGURA 2 - Determinação da intensidade integrada para o marcador imunohistoquímico citoplasmático, VEGF

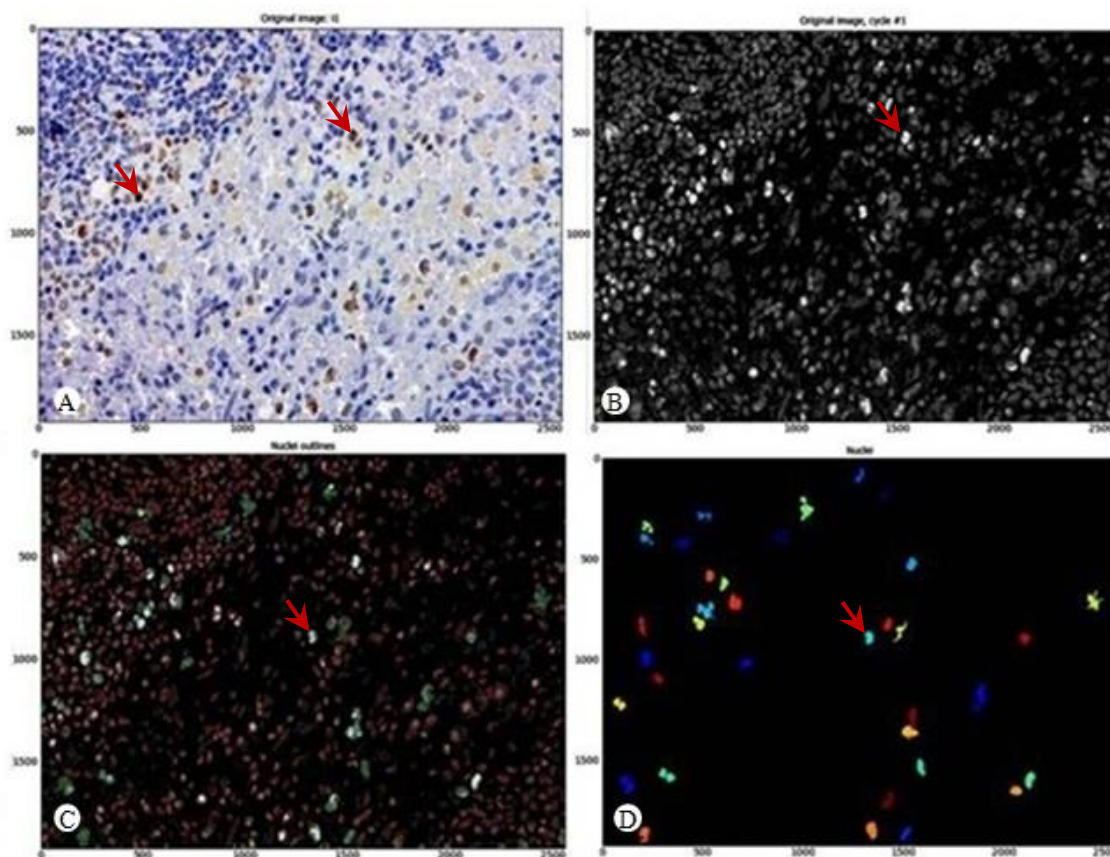


Observar foto original reconhecida pelo programa *Cell Profiler*, com o citoplasma corado por DAB (coloração marrom) (A), inversão da coloração por hematoxilina, nos núcleos (B), inversão da coloração por DAB, nas regiões citosólicas (C), e leitura da combinação espectral final (D).

Para os marcadores nucleares, Ki-67 e PCNA, procedeu-se de forma similar à inversão de cores, porém se destacava o marrom dos núcleos marcados *versus* o azul dos núcleos não marcados (FIG. 3B e 4B). Foi, então, realizada a

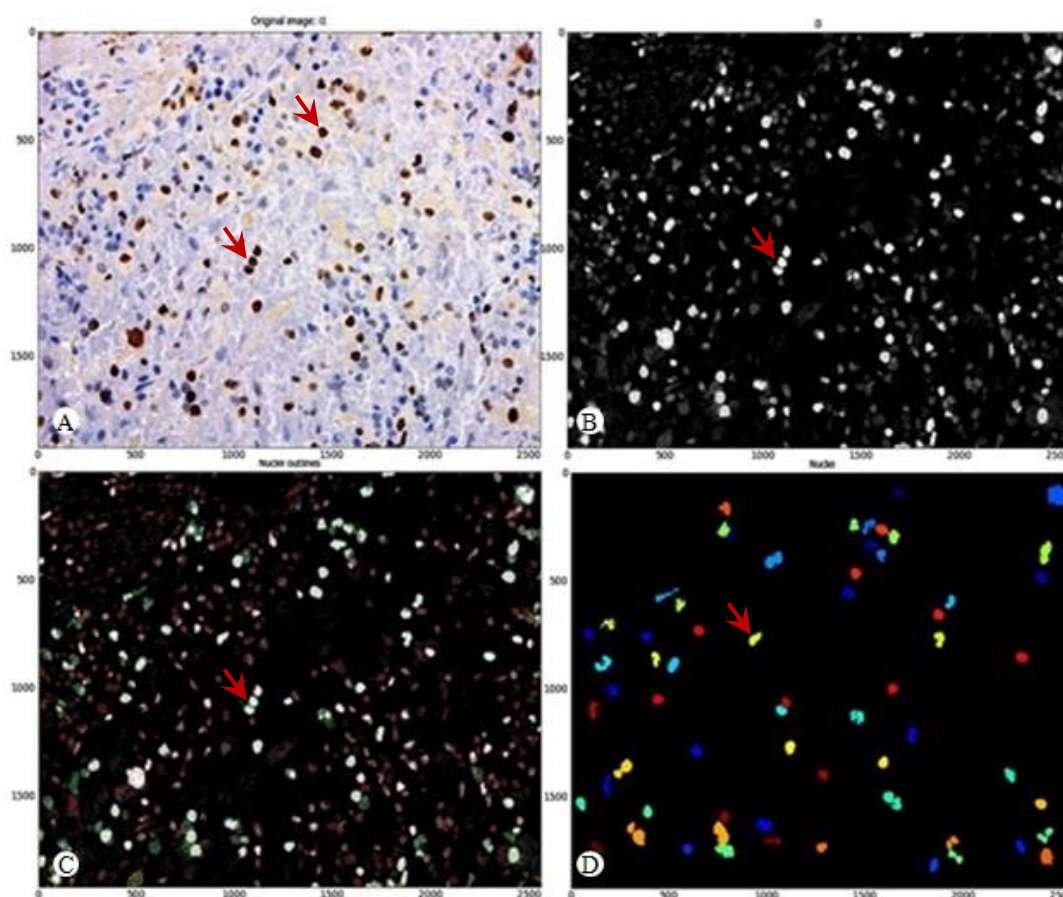
identificação de cada núcleo marcado (FIG. 3C e 4C), com exclusão de áreas não celulares, artefatos (FIG. 3D e 4D). Assim se contava a quantidade de núcleos marcados e foi gerada tabela com os valores finais (FIG. 3 e 4).

FIGURA 3 - Determinação do número de núcleos marcados em reações para a proteína de proliferação celular, Ki-67



Observar foto original reconhecida pelo programa *Cell Profiler*, com os núcleos corados por DAB (coloração marrom) (A), imagem invertida para escala de cinza e destaque para os núcleos no espectro marrom (B), estimativa da área celular ocupada por cada objeto identificado (C) e leitura dos núcleos sem presença de artefatos(D).

FIGURA 4 - Determinação do número de núcleos marcados em reações para a proteína de proliferação celular, PCNA



Observar foto original reconhecida pelo programa *Cell Profiler*, com os núcleos corados por DAB (coloração marrom) (A), imagem invertida para escala de cinza e destaque para os núcleos no espectro marrom (B), estimativa da área celular ocupada por cada objeto identificado (C) e leitura dos núcleos sem presença de artefatos(D).

4.7 Variáveis estudadas e testes estatísticos

Para verificar a normalidade da distribuição dos dados foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Para análise de dados de valores que não estavam em distribuição normal, foram empregados testes não paramétricos:

- a) Peso dos ratos; comprimento, largura e espessura do polo inferior do baço foram avaliados por meio da estatística descritiva para cálculo da média aritmética e desvio-padrão;

- b) o peso dos animais do pré-operatório foi comparado com o do pós-operatório (10^o, 15^o e 45^o dias) nos grupos A e B aplicando-se o teste de Wilcoxon para amostras pareadas;
- c) o comprimento, a largura e a espessura do polo inferior do baço dos animais do pré-operatório foram comparados com os do pós-operatório (15^o e 45^o dias) nos grupos A e B por intermédio do teste de Wilcoxon para amostras pareadas;
- d) a quantidade de células positivas marcadas para Ki-67 na análise IHQ foi comparada entre os grupos expostos ou não à OHB por meio do teste de Mann Whitney para amostras independentes;
- e) a quantidade de células positivas marcadas para PCNA na análise IHQ foi comparada entre os grupos expostos ou não à OHB a partir do teste de Mann Whitney para amostras independentes;
- f) a quantidade de células positivas marcadas para VEGF na análise IHQ foi comparada entre os grupos submetidos ou não à OHB por meio do teste t de Student para amostras independentes;
- g) para correlacionar o comprimento, a largura e a espessura do polo inferior do baço com a quantidade de células positivas marcadas na análise IHQ, foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman.
- h) para correlacionar a expressão de Ki-67 com a expressão de PCNA, foi calculado o coeficiente de correlação de Spearman.

Todos os testes foram bicaudais e os valores de “*p*” foram considerados significativos quando inferiores a 5%. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando-se o *software* Bioestat 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 Sobrevida e peso dos animais

Não houve óbito durante o experimento até o momento da eutanásia. Todos os animais perderam peso do primeiro ao 10º dia do pós-operatório, entretanto, o peso final foi maior do que o peso do início do experimento ($p=0,005$) (TAB. 3).

TABELA 3 - Peso (g) dos ratos no pré-operatório, no 10º dia e 15º ou 45º dias do pós-operatório de ESTPI, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica

Grupo	Subgrupo	Pré-	10º dia	p	Pós-	p ₁	p ₂
		operatório	Mediana		operatório		
A	A15	343,00	334,50	0,008*	349,50	0,262	0,005*
	A45	382,50	376,50	0,028*	449,50	0,005*	0,005*
B	B15	343,00	335,50	0,284	355,50	0,005*	0,005*
	B45	385,50	370,00	0,008*	458,00	0,005*	0,005*

A- grupo de animais após ESTPI, sem oxigenação hiperbárica. A15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15º dia. A45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45º dia.

B- grupo de animais após ESTPI, submetidos à oxigenação hiperbárica. B15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15º dia. B45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45º dia.

Teste de Wilcoxon para amostras pareadas. $p < 0,05$ significativo*. $p > 0,05$ não significativo.

p- comparação entre o peso dos animais do mesmo subgrupo, entre o pré-operatório e o 10º dia do experimento.

p₁- comparação entre o peso dos animais do mesmo subgrupo, entre o pré-operatório e o pós-operatório (15º e 45º dias) do experimento.

p₂- comparação entre o peso dos animais do mesmo subgrupo, entre o 10º dia e o pós-operatório (15º e 45º dias) do experimento.

5.2 Medida do polo inferior do baço

Em todos os subgrupos de animais não houve aumento das medidas de comprimento, largura e espessura do polo inferior do baço durante o experimento ($p > 0,05$) (TAB. 4, 5 e 6).

TABELA 4 - Comprimento (mm) do polo inferior do baço no momento da ESTPI, no 15º e 45º dias do pós-operatório dos ratos, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica

Grupo	Subgrupo	Comprimento inicial	Comprimento final	p
		Mediana	Mediana	
A	A15	1,00	1,10	0,838
	A45	1,00	1,20	0,575
B	B15	1,00	1,10	0,398
	B45	0,90	1,10	0,173

A- grupo de animais após ESTPI, sem oxigenação hiperbárica. A15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15º dia. A45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45º dia.

B- grupo de animais após ESTPI, submetidos à oxigenação hiperbárica. B15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15º dia. B45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45º dia.

Teste de Wilcoxon para amostras pareadas. $p < 0,05$ significativo*. $p > 0,05$ não significativo.

p- comparação entre o comprimento do polo inferior do baço dos animais do mesmo subgrupo, entre o início e o final do experimento.

TABELA 5 - Largura (mm) do polo inferior do baço no momento da ESTPI, no 15º e 45º dias do pós-operatório dos ratos, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica

Grupo	Subgrupo	Largura inicial	Largura final	p
		Mediana	Mediana	
A	A15	0,80	0,90	0,343
	A45	0,80	1,00	0,646
B	B15	0,90	1,00	0,236
	B45	0,80	0,85	0,271

A- grupo de animais após ESTPI, sem oxigenação hiperbárica. A15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15º dia. A45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45º dia.

B- grupo de animais após ESTPI, submetidos à oxigenação hiperbárica. B15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15º dia. B45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45º dia.

Teste de Wilcoxon para amostras pareadas. $p < 0,05$ significativo*. $p > 0,05$ não significativo.

p- comparação entre a largura do polo inferior do baço dos animais do mesmo subgrupo, entre o início e o final do experimento.

TABELA 6 - Espessura (mm) do polo inferior do baço no momento da ESTPI, no 15º e 45º dias do pós-operatório dos ratos, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica

Grupo	Subgrupo	Espessura inicial	Espessura final	p
		Mediana	Mediana	
A	A15	0,40	0,40	0,285
	A45	0,40	0,45	0,594
B	B15	0,40	0,40	0,173
	B45	0,35	0,40	0,674

A- grupo de animais após ESTPI, sem oxigenação hiperbárica. A15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15º dia. A45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45º dia.

B- grupo de animais após ESTPI, submetidos à oxigenação hiperbárica. B15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15º dia. B45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45º dia.

Teste de Wilcoxon para amostras pareadas. $p < 0,05$ significativo. $p > 0,05$ não significativo.

p- comparação entre a espessura do polo inferior do baço dos animais do mesmo subgrupo, entre o início e o final do experimento.

5.3 Imuno-histoquímica

5.3.1 Expressão de Ki-67

A proliferação celular avaliada por meio do Ki-67 foi identificada em todos os grupos de animais (FIG. 5). No grupo A, sem OHB, os animais do subgrupo de 45 dias apresentaram aumento significativo de células positivas em comparação aos do subgrupo de 15 dias ($p=0,001$). No grupo B, submetidos à OHB, não houve diferença entre os animais dos subgrupos de 45 dias e 15 dias ($p=0,623$).

Os animais dos subgrupos submetidos à OHB, nos tempos de 15 e 45 dias, exibiram maior imunoexpressão de Ki-67 que os dos subgrupos sem OHB ($p < 0,05$) (TAB. 7).

TABELA 7 - Expressão de Ki-67 no polo inferior do baço de ratos após ESTPI, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica, nos 15^o e 45^o dias do pós-operatório

Grupo	Subgrupo	Ki-67	p ₁	p ₂
		Mediana		
A	A15	26,60	0,001*	0,0006*
	A45	39,85		
B	B15	50,10	0,623	0,003*
	B45	55,40		

A- grupo de animais após ESTPI, sem oxigenação hiperbárica. A15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15^o dia. A45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45^o dia.

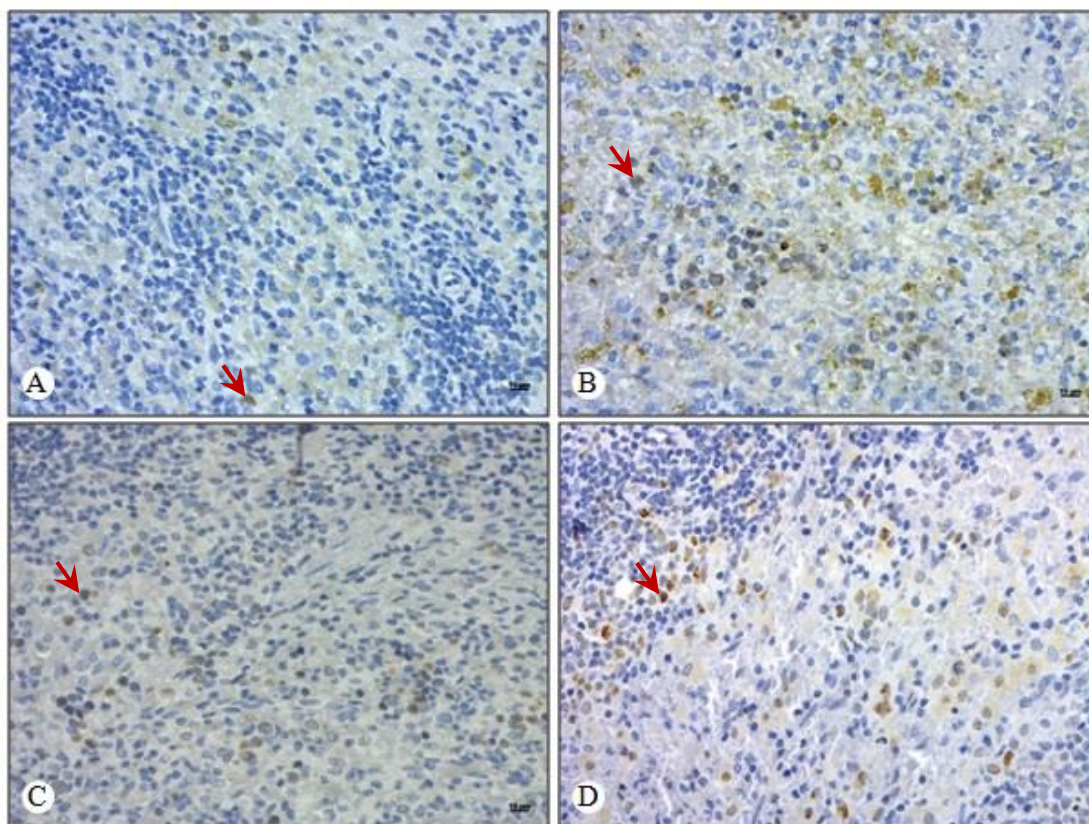
B- grupo de animais após ESTPI, submetidos à oxigenação hiperbárica. B15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15^o dia. B45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45^o dia.

Teste de Mann Whitney para amostras independentes. $p < 0,05$ significativo*. $p > 0,05$ não significativo.

p₁- comparação entre os subgrupos A15 e A45 e entre os subgrupos B15 e B45.

p₂- comparação entre os subgrupos A15 e B15 e entre os subgrupos A45 e B45.

FIGURA 5 - Fotomicrografias com marcações nucleares por Ki-67 em cortes histológicos do polo inferior do baço de ratos



Observar a expressão de Ki-67 por meio de núcleos marcados por DAB (coloração marrom) nos subgrupos A15 (A), A45 (B), B15 (C) e B45 (D). Aumento de 400x.

5.3.2 Expressão de PCNA

A expressão de PCNA foi imunopositiva em todos os subgrupos de animais (FIG. 6). Nos grupos A e B, os animais dos subgrupos de 45 dias apresentaram maior quantidade de células positivas marcadas quando comparados aos dos subgrupos de 15 dias ($p < 0,05$). Os animais do subgrupo B15, submetidos à oxigenação hiperbárica, apresentaram maior imunopositividade que os do subgrupo A15, sem OHB ($p = 0,002$) (TAB. 8).

TABELA 8 - Expressão de PCNA no polo inferior do baço de ratos após ESTPI, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica, nos 15^o e 45^o dias do pós-operatório

Grupo	Subgrupo	PCNA Mediana	p ₁	p ₂
A	A15	76,20	0,0003*	0,002*
	A45	154,60		
B	B15	106,55	0,019*	0,820
	B45	145,30		

A- grupo de animais após ESTPI, sem oxigenação hiperbárica. A15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15^o dia. A45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45^o dia.

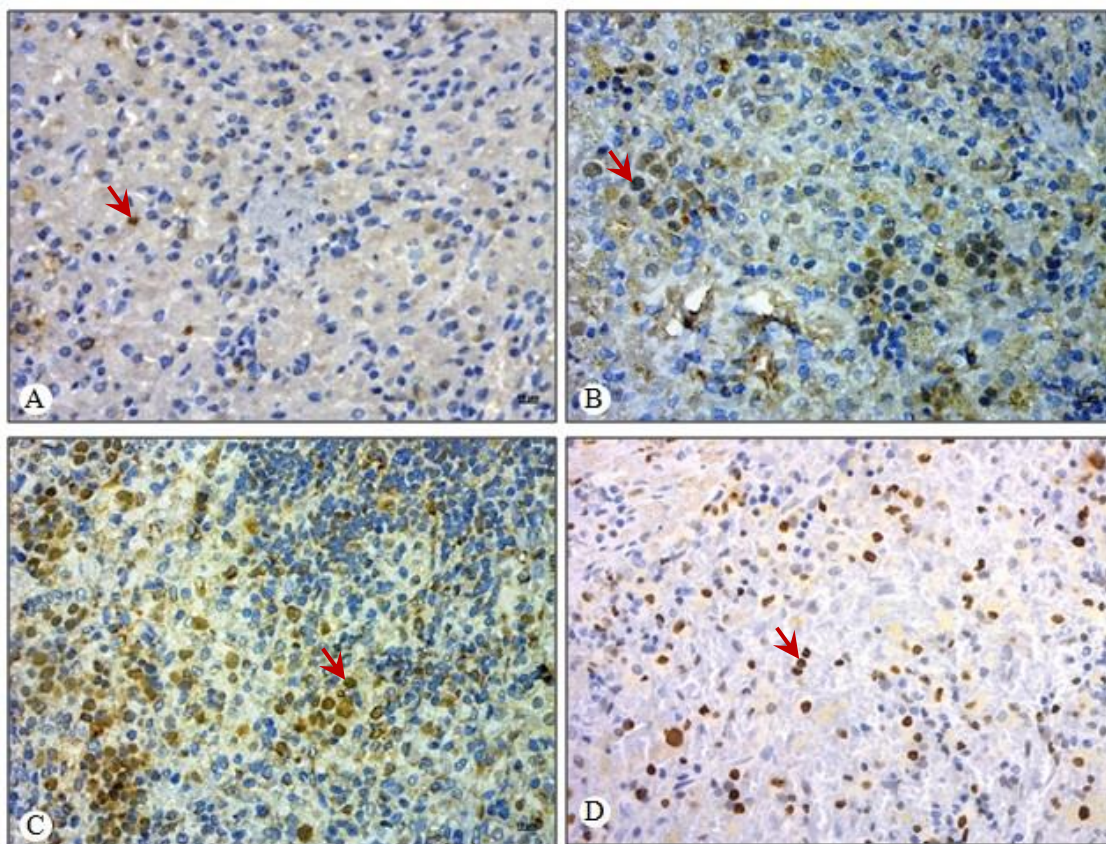
B- grupo de animais após ESTPI, submetidos à oxigenação hiperbárica. B15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15^o dia. B45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45^o dia.

Teste de Mann Whitney para amostras independentes. $p < 0,05$ significativo*. $p > 0,05$ não significativo.

p₁- comparação entre os subgrupos A15 e A45 e entre os subgrupos B15 e B45.

p₂- comparação entre os subgrupos A15 e B15 e entre os subgrupos A45 e B45.

FIGURA 6 - Fotomicrografias com marcações nucleares por PCNA em cortes histológicos do polo inferior do baço de ratos



Observar a expressão de PCNA por meio de núcleos marcados por DAB (coloração marrom) nos subgrupos A15 (A), A45 (B), B15 (C) e B45 (D). Aumento de 400x.

5.3.3 Expressão de VEGF

A imunoexpressão de VEGF no polo inferior do baço foi constatada nos animais submetidos ou não à OHB e não houve diferença na comparação entre os subgrupos ($p > 0,05$) (FIG. 7, TAB. 9).

TABELA 9 - Expressão de VEGF no polo inferior do baço de ratos após ESTPI, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica, nos 15^o e 45^o dias do pós-operatório

Grupo	Subgrupo	VEGF	p ₁	p ₂
		M.A ± E.P		
A	A15	1943,17 ± 129,15	0,141	0,156
	A45	2246,36 ± 145,57		
B	B15	2165,37 ± 82,40	0,821	0,825
	B45	2201,73 ± 136,09		

A- grupo de animais após ESTPI, sem oxigenação hiperbárica. A15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15^o dia. A45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45^o dia.

B- grupo de animais após ESTPI, submetidos à oxigenação hiperbárica. B15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15^o dia. B45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45^o dia.

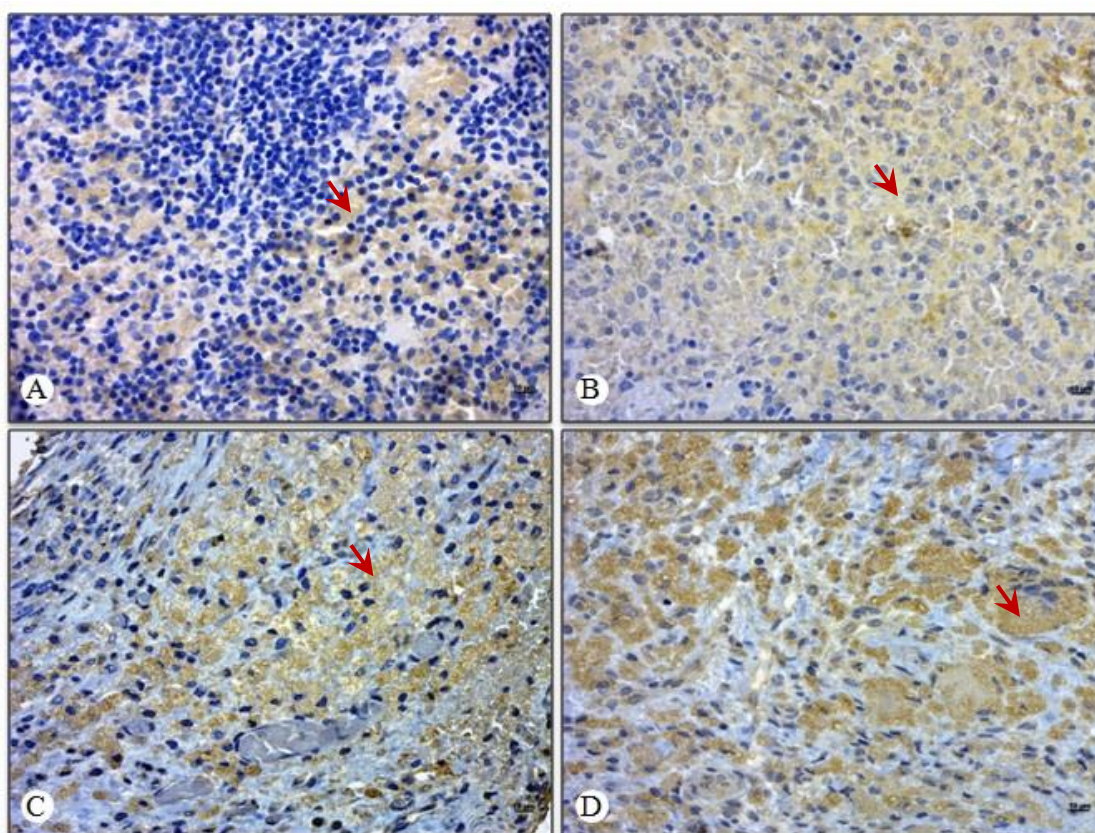
M.A- Média aritmética. **E.P-** Erro padrão.

Teste t de Student para amostras independentes. $p < 0,05$ significativo*. $p > 0,05$ não significativo.

p₁- comparação entre os subgrupos A15 e A45 e entre os subgrupos B15 e B45.

p₂- comparação entre os subgrupos A15 e B15 e entre os subgrupos A45 e B45.

FIGURA 7 - Fotomicrografias com marcações citoplasmáticas por VEGF em cortes histológicos do polo inferior do baço de ratos



Observar a expressão de VEGF por meio do citoplasma marcado por DAB (coloração marrom) nos subgrupos A15 (A), A45 (B), B15 (C) e B45 (D). Aumento de 400x.

5.4 Correlação entre as medidas do polo inferior do baço e as expressões proteicas

5.4.1 Antígeno nuclear associado ao ciclo celular (Ki-67)

A expressão do Ki-67 não se correlacionou com as medidas de comprimento, largura e espessura do polo inferior do baço nos subgrupos de animais submetidos ou não à oxigenação hiperbárica ($p > 0,05$) (TAB. 10).

TABELA 10 - Correlação entre a expressão do Ki-67 e as medidas do polo inferior do baço de ratos após ESTPI, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica, nos 15^o e 45^o dias do pós-operatório

Grupo	Subgrupo	Comprimento x Ki-67		Largura x Ki-67		Espessura x Ki-67	
		CC	p	CC	p	CC	p
Grupo A	A15	0,16	0,653	-0,05	0,879	0,09	0,789
	A45	-0,18	0,602	-0,26	0,463	-0,57	0,083
Grupo B	B15	-0,25	0,480	0,27	0,449	0,49	0,144
	B45	-0,57	0,083	-0,27	0,447	-0,32	0,354

A- grupo de animais após ESTPI, sem oxigenação hiperbárica. A15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15^o dia. A45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45^o dia.

B- grupo de animais após ESTPI, submetidos à oxigenação hiperbárica. B15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15^o dia. B45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45^o dia.

Correlação de Spearman. **CC-** Coeficiente de Correlação. $p < 0,05$ significativo*. $p > 0,05$ não significativo.

5.4.2 Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)

A expressão celular por PCNA correlacionou-se significativamente com a largura no subgrupo B15 ($p = 0,048$) e com o comprimento do polo inferior do baço no subgrupo B45 ($p = 0,018$), entretanto, nos animais do grupo A, sem oxigenação hiperbárica, não houve correlação significativa entre a expressão do PCNA e as medidas do polo inferior do baço ($p > 0,05$) (TAB. 11).

TABELA 11 - Correlação entre a expressão do PCNA e as medidas do polo inferior do baço de ratos após ESTPI, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica, nos 15^o e 45^o dias do pós-operatório

Grupo	Subgrupo	Comprimento x PCNA		Largura x PCNA		Espessura x PCNA	
		CC	p	CC	p	CC	p
Grupo A	A15	0,21	0,543	-0,31	0,378	0,18	0,606
	A45	-0,06	0,863	-0,05	0,877	-0,38	0,268
Grupo B	B15	-0,26	0,457	-0,63	0,048*	-0,15	0,660
	B45	-0,72	0,018*	-0,50	0,135	-0,35	0,316

A- grupo de animais após ESTPI, sem oxigenação hiperbárica. A15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15^o dia. A45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45^o dia.

B- grupo de animais após ESTPI, submetidos à oxigenação hiperbárica. B15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15^o dia. B45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45^o dia.

Correlação de Spearman. **CC-** Coeficiente de Correlação. $p < 0,05$ significativo*. $p > 0,05$ não significativo.

5.4.3 Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF)

A expressão do VEGF correlacionou-se significativamente com as medidas do polo inferior do baço dos animais do subgrupo B45 ($p=0,004$), entretanto, não houve correlação significativa dessas variáveis nos subgrupos de animais A15, A45 e B15 ($p > 0,05$) (TAB. 12).

TABELA 12 - Correlação entre a expressão do VEGF e as medidas do polo inferior do baço de ratos após ESTPI, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica, nos 15^o e 45^o dias do pós-operatório

Grupo	Subgrupo	Comprimento x VEGF		Largura x VEGF		Espessura x VEGF	
		CC	p	CC	p	CC	p
Grupo A	A15	0,62	0,053	0,61	0,055	0,30	0,390
	A45	-0,20	0,578	-0,006	0,986	-0,03	0,930
Grupo B	B15	-0,45	0,184	-0,107	0,768	-0,07	0,834
	B45	0,74	0,014*	0,648	0,042*	0,80	0,004*

A- grupo de animais após ESTPI, sem oxigenação hiperbárica. A15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15^o dia. A45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45^o dia.

B- grupo de animais após ESTPI, submetidos à oxigenação hiperbárica. B15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15^o dia. B45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45^o dia.

Correlação de Spearman. **CC-** Coeficiente de Correlação. $p < 0,05$ significativo*. $p > 0,05$ não significativo.

5.5 Correlação entre Ki-67 e PCNA

As análises de correlação entre os marcadores nucleares, Ki-67 e PCNA, revelaram que houve diferença no subgrupo B45 ($p=0,037$), entretanto, não houve diferença nos subgrupos de animais A15, A45 e B15 ($p > 0,05$) (TAB. 13).

TABELA 13 - Correlação entre a expressão de Ki-67 e PCNA no polo inferior do baço de ratos após ESTPI, submetidos ou não à oxigenação hiperbárica, nos 15^o e 45^o dias do pós-operatório

Grupo	Subgrupo	Ki-67 x PCNA	
		CC	p
Grupo A	A15	-0,05	0,898
	A45	0,16	0,651
Grupo B	B15	-0,49	0,148
	B45	0,66	0,037*

A- grupo de animais após ESTPI, sem oxigenação hiperbárica. A15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15^o dia. A45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45^o dia.

B- grupo de animais após ESTPI, submetidos à oxigenação hiperbárica. B15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15^o dia. B45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45^o dia.

Correlação de Spearman. **CC-** Coeficiente de Correlação. $p < 0,05$ significativo*. $p > 0,05$ não significativo.

6 DISCUSSÃO

Muitos estudos experimentais têm sido realizados para entender melhor as propriedades biológicas da oxigenação hiperbárica. Esse procedimento exerce seus efeitos terapêuticos por meio da alta concentração de oxigênio fornecido a 100%, sob pressão, dissolvido nos líquidos teciduais⁷⁴⁻⁷⁶. Entre seus principais efeitos estão a proliferação de fibroblastos, neovascularização, atividade osteoclástica e osteoblástica e ação antimicrobiana^{74,75}. A OHB é usada no tratamento de muitas doenças inflamatórias e isquêmicas, tais como feridas, intoxicação por monóxido de carbono e infecção necrótica aguda⁷⁷. O aumento de dissolução de oxigênio no sangue causa oxigenação em áreas com hipóxia⁷⁷. A hiperóxia em tecidos normais provoca vasoconstrição rápida, que é compensada pelo aumento de transporte de oxigênio no plasma e o fluxo sanguíneo microvascular no tecido isquêmico é efetivamente melhorado⁷⁸.

Paulo *et al.* estudaram o efeito da OHB no polo inferior do baço de ratos submetidos à esplenectomia subtotal^{39-41,72}. Esse relato foi realizado em cães^{17,30} e ratos^{19,35-38} como técnica viável para preservação parcial do baço. Estudo experimental mostrou melhor função do polo inferior do baço após OHB³⁹. Em outro estudo, constatou-se melhor vitalidade dessa estrutura, mas a função manteve-se preservada somente na avaliação precoce⁴⁰. Outro estudo identificou que a OHB melhorou a vitalidade do polo inferior do baço e, em histologia convencional, aumentou a proliferação celular e vascular⁴¹. Trabalho mais recente sugere que a OHB aumenta a proliferação celular e contribui para a regeneração esplênica⁷².

Neste estudo, todos os animais sobreviveram até a eutanásia. Entre o primeiro e o 10º dia do pós-operatório, houve perda de peso, entretanto, o peso final foi maior que o inicial, independentemente se submetidos ou não à oxigenação hiperbárica. Esses resultados confirmaram estudo prévio⁴¹, que as possíveis causas de emagrecimento foram a manipulação diária dos ratos, sua permanência dentro da câmara hiperbárica no período previsto pelo protocolo e o estresse resultante do procedimento cirúrgico.

A regeneração do polo inferior do baço no período de 45 dias foi descrita por Torres *et al.*³⁴ em modelo de esplenectomia subtotal diferente da ESTPI. Em 2011, Paulo *et al.* mostraram que animais expostos ou não à OHB, no período de 45 dias, apresentaram crescimento do polo inferior do baço⁴¹. No presente estudo, o crescimento do polo inferior do baço não foi significativo. É provável que o tempo máximo de 45 dias empregado nesse experimento possa ter sido um fator limitante, uma vez que o polo inferior do baço cresceu significativamente em comprimento, largura e espessura no período de 80 dias³⁶.

Costa-Val *et al.* empregaram análise histológica convencional e não acusaram proliferação celular do baço e fígado em ratos submetidos à OHB a 2,5 atmosferas por 90 minutos em 20 dias consecutivos, mas encontraram redução significativa de eritropoiese hepática extramedular⁷⁹. Em protocolo diferente de OHB, Paulo *et al.* usaram histologia convencional e relataram que os animais submetidos à OHB a 2,5 atmosferas por 120 minutos em 10 dias consecutivos tiveram mais proliferação celular e maior número de vasos no polo inferior do baço, na comparação com os animais que não foram submetidos a esse procedimento⁴¹.

A expressão proteica por análise IHQ de PCNA, Ki-67 e VEGF em ratos após ESTPI e submetidos ou não à OHB foi empregada com a finalidade de aprimorar os métodos para detecção de proliferação celular e vascular com informações precisas e quantificáveis. Adicionalmente, foi verificada se a expressão desses marcadores se correlacionou com as medidas de comprimento, largura e espessura do polo inferior do baço.

O método IHQ, cada vez mais difundido entre os laboratórios de patologia e com melhores resultados à medida que as técnicas vão se aprimorando, encontram-se entre os mais úteis e mais comumente usados para avaliação da proliferação celular⁸⁰. No entanto, não foram encontrados na literatura, publicações sobre a avaliação IHQ da proliferação celular e vascular do baço após ESTPI e OHB, além da publicação originada desta pesquisa (APÊNDICE A), na qual foi utilizado o PCNA como marcador IHQ⁷².

O Ki-67 e o PCNA são os dois marcadores de proliferação celular mais amplamente utilizados⁴⁶⁻⁴⁸. O VEGF é considerado o principal estimulador da angiogênese e está associado ao início do processo de neoformação vascular, sendo igualmente considerado um marcador confiável desse processo⁸¹⁻⁸³.

Nesta pesquisa, apurou-se que os espécimes de polo inferior do baço apresentaram expressão IHQ para os três marcadores, o que pode ser atribuído à metodologia adotada com a aplicação de aquecimento em banho-maria a 96°C para recuperação antigênica. Contudo, a explicação mais adequada para essa expressão é o bom estado de conservação dos tecidos esplênicos, pois esses espécimes foram fixados em formalina tamponada neutra a 10% (pH 7,0) por 24 a 48 horas, uma vez que a permanência prolongada nessa solução causaria redução ou até mesmo anulação da expressão dos antígenos⁸⁴.

Análise da expressão de Ki-67 no polo inferior do baço de animais expostos à OHB mostrou maior quantidade de células positivas quando comparados com os animais sem essa exposição. O mesmo foi verificado quando se comparou o subgrupo de 45 dias com o de 15 dias no grupo de animais sem exposição à OHB. Entretanto, nos animais do grupo B, expostos à OHB, a diferença não foi significativa. Esses dados sugerem que a proliferação celular do polo inferior do baço sofreu a influência da OHB e do tempo de coleta do material mais tardiamente.

Neste trabalho não foi encontrada correlação positiva entre o crescimento do polo inferior do baço e a expressão de Ki-67. Koh *et al.* (2009) estudaram os possíveis efeitos moduladores da OHB (sessão de 115 minutos por dia) na pancreatite aguda grave nos tempos um, dois e três dias. Os autores ressaltaram que a OHB pode contribuir para o tratamento dessa doença por meio da promoção da proliferação celular, expressa por Ki-67⁸⁵. No primeiro dia de oxigenação hiperbárica, a expressão de Ki-67 mostrou que houve diminuição da taxa de proliferação celular, entretanto, houve aumento dessas taxas nos dias dois e três⁸⁵. Mais estudos a respeito da expressão de Ki-67 em tecido esplênico após esplenectomia subtotal e OHB precisam ser realizados, pois não foram encontradas publicações que possam ser comparadas com o presente estudo.

A análise da expressão de PCNA no polo inferior do baço nos subgrupos de 15 dias (A15 e B15) revelou que os animais expostos à OHB tiveram significativa presença de células positivas em relação ao subgrupo sem OHB. Uma justificativa para esse resultado é que a coleta do material de 15 dias está mais próxima da última sessão de OHB, que ocorreu no 10º dia. A análise de PCNA nos subgrupos de animais sem exposição à OHB (A15 e A45) exibiu maior expressão desse marcador no subgrupo de 45 dias. O mesmo resultado foi

registrado entre os subgrupos B15 e B45. Esses dados sugerem que a proliferação celular do polo inferior do baço sofre a influência do tempo de coleta mais tardio, estando os animais expostos ou não à OHB. Diferentemente do Ki-67, a expressão de PCNA correlacionou-se positivamente com a largura do polo inferior do baço no subgrupo B15 e o comprimento no subgrupo B45. Pode-se inferir, portanto, que o crescimento do polo inferior do baço tende a afetar a imunexpressão do PCNA nos animais submetidos à OHB no 15^o e 45^o dias do pós-operatório.

Estudo utilizando PCNA como marcador de proliferação celular⁷² também evidenciou que essa proteína foi imunopositiva em todos os subgrupos de animais submetidos à ESTPI com exposição ou não à OHB, sendo que os subgrupos submetidos à OHB tiveram maior imunexpressão, independentemente do tempo de coleta do espécime. Verificou-se, também, que o índice de positividade do PCNA foi significativamente maior no pós-operatório de 45 dias que o de 15 dias, somente nos animais submetidos à OHB. A análise quantitativa das células PCNA positivas sugeriu que a OHB aumenta a proliferação celular e contribui para a regeneração esplênica⁷².

Avaliação em tecido renal mostrou que a OHB a 2,5 atmosferas por 90 minutos em dois dias diminuiu a necrose, mas não aumentou a imunexpressão de PCNA, devido provavelmente ao tempo insuficiente de aplicação dessa terapêutica⁸⁶. Alguns autores^{77,87,88} usaram o PCNA para avaliar a proliferação celular e salientaram que a OHB promoveu a regeneração do fígado em ratos submetidos à extirpação de 70% desse órgão. Houve aumento na proliferação celular, cujo índice de positividade variou de 4 a 69% em grupos de animais submetidos à OHB e de 1,4 a 50% nos grupos sem esse procedimento. A pressão usada nesses grupos variou de 2,0 a 2,8 atmosferas, sendo 2,5 atmosferas a mais empregada.

Nesta pesquisa, a correlação positiva entre a expressão de Ki-67 e de PCNA foi observada nos subgrupos de animais submetidos à OHB, no tempo de 45 dias. Esposito *et al.* avaliaram, por meio da IHQ, a expressão de ambas as proteínas e consideraram esses marcadores um método objetivo e quantificável mais sensível e específico que a contagem do número de mitoses na histologia convencional⁸⁹.

O VEGF foi expresso no polo inferior do baço dos animais dos grupos submetidos ou não à OHB. No entanto, os resultados encontrados não mostraram alteração significativa entre os subgrupos expostos ou não à OHB e o tempo de coleta. A partir desses achados, algumas questões foram suscitadas e faz-se necessário encontrar explicações para esses resultados, além de propor novos estudos:

- a) A ESTPI pode causar isquemia no remanescente esplênico? Após a isquemia, o processo de angiogênese se inicia entre um e três dias, sendo modulado por fatores de crescimento que se localizam nas células endoteliais e na matriz extracelular⁷⁴. A expressão do VEGF é verificada após estímulo da angiogênese e diante de hipóxia tecidual⁶⁰. Uma justificativa para explicar a ausência de diferença na produção de VEGF entre os dois grupos é que nos animais que não foram submetidos à OHB o segmento do baço poderia apresentar isquemia devido ao procedimento cirúrgico e, assim, estimular a produção do VEGF. Para esclarecer essa dúvida seria necessário estudo utilizando animais com baço íntegro, com e sem exposição à OHB;
- b) a OHB por 10 dias consecutivos poderia inibir a produção de VEGF? Segundo Iazzetti (2003)⁷⁴ e Lacerda *et al.* (2006)⁷⁵, durante as sessões de OHB os tecidos recebem maior quantidade de oxigênio que o normal. Imediatamente após a sessão, os tecidos corporais são submetidos à hipóxia relativa (volta à concentração normal de oxigênio), efeito este responsável pela estimulação da neovascularização^{74,75}. É provável a existência de subgrupo de animais com a mesma quantidade de dias de OHB, destacando-se que se a coleta de material for realizada mais próxima do término da OHB, pode apresentar maior expressão de VEGF;
- c) o protocolo de OHB utilizado neste estudo pode ter sido um fator limitante? Ijichi *et al.* enfatizaram que a OHB em 24 e 48 horas reduz a lesão na regeneração do fígado de ratos após a hepatectomia parcial por meio da maior expressão de VEGF⁶⁸. Pesquisas futuras poderão sugerir protocolos com número de sessões reduzidas.

Este estudo encontrou correlação positiva entre o crescimento do polo inferior do baço e a expressão de VEGF no subgrupo B45. Esse resultado sugere que o crescimento do polo inferior do baço tende a afetar a imunoexpressão do VEGF nos animais submetidos à OHB no 45º dia do pós-operatório. É importante lembrar que a OHB foi administrada durante os 10 primeiros dias do pós-operatório e que o subgrupo B45 ficou sem o referido procedimento por 35 dias⁴¹.

A IHQ revelou-se adequada para avaliar a proliferação celular e vascular no polo inferior do baço de ratos, especialmente com a utilização de critérios objetivos com auxílio de *software* para quantificar o número de núcleos marcados para PCNA e Ki-67 e citoplasmática para VEGF.

Os resultados encontrados podem contribuir para avançar no entendimento das propriedades biológicas da OHB e podem ser úteis nas decisões clínicas quanto ao uso dessa terapia em pacientes submetidos à cirurgia conservadora do baço. A OHB foi empregada como terapia adjuvante e eficaz nas cicatrizações de feridas, no combate a infecções graves, na proliferação de tecidos e na neovascularização⁷⁵. No entanto, mais estudos são necessários para aumentar o conhecimento sobre o mecanismo molecular no tecido esplênico após ESTPI e OHB.

7 CONCLUSÕES

- a) A oxigenação hiperbárica após esplenectomia subtotal aumentou a proliferação celular expressa por Ki-67 e PCNA e não aumentou a proliferação vascular expressa por VEGF no polo inferior do baço.
- b) Nos animais submetidos à oxigenação hiperbárica, houve relação entre o tamanho do polo inferior do baço e a quantidade de células positivas para PCNA e VEGF, mas essa relação não foi encontrada para o Ki-67.

8 REFERÊNCIAS

1. Shandling B. Splenectomy for trauma: a second look. *Arch Surg.* 1976; 111(12): 1325-6.
2. Crosby WH. An historical sketch of splenic function and splenectomy. *Lymphology.* 1983; 16(2):52-5.
3. Cooper MJ, Williamson RC. Splenectomy: indications, hazards and alternatives. *Br J Surg.* 1984; 71(3):173-80.
4. Feliciano DV, Bitondo CG, Mattox KL, Rumisek JD, Burch JM, Jordan GL Jr. A four-year experience with splenectomy versus splenorrhaphy. *Ann Surg.* 1985; 201(5):568-75.
5. King H, Shumacker Jr HB. Splenic studies. *Ann Surg.* 1952; 136:239-42.
6. Hansen K, Singer DB. Asplenic-hyposplenic overwhelming sepsis: postsplenectomy sepsis revisited. *Pediatr Dev Pathol.* 2001; 4(2):105-21.
7. Singer D. Postsplenectomy sepsis. *Perspect Pediatr Pathol* 1973; 1:285-311.
8. Morris DH, Bullock FD. The importance of the spleen in resistance to infection. *Ann Surg.* 1919; 70(5):513-21.
9. Grosfeld JL, Ranochak JE. Are hemisplenectomy and/or primary splenic repair feasible? *J Pediatr Surg.* 1976; 11(3):419-24.
10. Goldthorn JF, Schwartz AD, Swift AJ, Winkelstein JA. Protective effect of residual splenic tissue after subtotal splenectomy. *J Pediatr Surg.* 1978; 13(6D): 587-90.
11. Andersson R, Alwmark A, Bengmark S. Outcome of pneumococcal challenge in rats after splenic artery ligation or splenectomy. *Acta Chir Scand.* 1986; 152:15-7.
12. Robinette CD, Fraumeni JF Jr. Splenectomy and subsequent mortality in veterans of the 1939-45 war. *Lancet.* 1977; 2(8029):127-29.
13. Sugihara T, Yawata Y. Observations on plasma and red cell lipids in hereditary spherocytosis. *Clin Chim Acta.* 1984; 137(2):227-32.
14. Aviram M, Brook JG, Tatarsky J, Levy Y, Carter A. Increased low-density lipoprotein levels after splenectomy: a role for the spleen in cholesterol metabolism in myeloproliferative disorders. *Am J Med Sci.* 1986; 291(1):25-8.

15. Asai K, Kuzuya M, Naito M, Funaki C, Kuzuya F. Effects of splenectomy on serum lipids and experimental atherosclerosis. *Angiology*. 1988; 39(6):497-504.
16. Fatouros M, Bourantas K, Bairaktari E, Elisaf M, Tsolas O, Cassiouis D. Role of the spleen in lipid metabolism. *Br J Surg*. 1995; 82(12):1675-7.
17. Paulo DNS, Lázaro da Silva A. Lipídeos plasmáticos após esplenectomia total e parcial em cães. *Rev Col Bras Cir*. 2001; 28(3):264-70.
18. Silva MM, Jamel N, Refinetti RA, Oliveira MAS, Padilha MS. Papel do baço no perfil lipídico - Estudo Experimental. *ABCD Arq Bras Cir Dig*. 2002; 15(2):121-4.
19. Paulo ICAL, Paulo DNS, Lázaro da Silva A, Foletto RM, Colnago GL, Vargas PM. Níveis de lípidos plasmáticos em ratos submetidos à esplenectomia total, ligadura simultânea dos vasos esplênicos e a esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior. *Rev Col Bras Cir*. 2005; 32(5):229-36.
20. Petroianu A, Veloso DFM, Costa GR, Alberti LR. Efeitos de operações sobre o baço no lipidograma de ratas. *Rev Assoc Med Bras*. 2006; 52(1):56-9.
21. Witztum JL. Splenic immunity and atherosclerosis; a glimpse into a novel paradigm? *J Clin Invest*. 2002; 109(6):721-4.
22. Warshaw AL. Conservation of the spleen with distal pancreatectomy. *Arch Surg*. 1988; 123(5):550-3.
23. Zilberstein B, Sallet JA, Ramos A, Eshkenazy R. Video laparoscopy for the treatment of bleeding esophageal varices. *Surg Laparosc Endosc*. 1997; 7(3):185-91.
24. Poulin EC, Mamazza J, Schlachta CM. Splenic artery embolization before laparoscopic splenectomy. An update. *Surg Endosc*. 1998; 12(6):870-5.
25. Schertler T, Pfammatter T, Eid K, Wildermuth S. Embolization of the splenic artery after splenic gunshot wound. *Swiss Surg*. 2003; 9(2):87-91.
26. Mignon F, Brouzes S, Breitel DL, Bastie JN, Poirier H, Legendre C, *et al*. Preoperative selective embolization allowing a partial splenectomy for splenic hamartoma. *Ann Chir*. 2003; 128(2):112-6.
27. Campos-Christo M. Esplenectomias parciais regradas. *O Hospital*. 1959; 56(4):93-8.
28. Toy FK, Reed WP, Taylor LS. Experimental splenic preservation employing microwave surgical techniques: a preliminary report. *Surgery*. 1984; 96(1):117-21.

29. Petroianu A. Esplenectomia subtotal e anastomose esplenorrenal proximal para o tratamento da hipertensão portal. *Rev Bras Cir.* 1983; 73(3):101-4.
30. Paulo DNS, Silva AL, Cintra LC, Bof AM, Santiago DC, Ribeiro GB. Esplenectomia subtotal, em cães, com preservação do polo inferior suprido por vasos do ligamento gastroesplênico. *Rev Col Bras Cir.* 1999; 26(3):147-52.
31. Katsura S, Kawamura D, Harada E, Enoki T, Hamano K. Single-incision laparoscopic splenectomy and splenic autotransplantation for an enlarged wandering spleen with torsion. *European J Pediatr Surg Rep.* 2014 June; 2(1): 23-5.
32. Marques RG. Autoimplante esplênico em ratos: regeneração morfológica e função fagocitária [tese-Doutorado]. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; 2001.
33. Resende V, Petroianu A, Júnior CW. Autotransplantation for treatment of severe splenic lesions. *Emerg Radiol.* 2002; 9(4): 208-12.
34. Torres OJM, Macedo EL, Picciani ERG, Nunes PMS, Costa JVG, Carvalho AB, *et al.* Estudo histológico da regeneração esplênica de ratos submetidos à esplenectomia subtotal. *Acta Cir Bras.* 2000; 15(2): 1-12.
35. Paulo DNS, Paulo ICAL, Kalil M, Vargas PM, Silva AL, Baptista JFA, *et al.* Subtotal splenectomy preserving the lower pole in rats: technical, morphological and functional aspects. *Acta Cir Bras.* 2006; 21(5):321-7.
36. Paulo DNS, Ramos BF, Zanetti FR, Marques T, Cintra LC, Paulo ICAL, *et al.* Growth of the lower spleen pole remaining after subtotal splenectomy in rats. *Acta Cir Bras.* 2008; 23(2):125-9.
37. Silva JJ, Silva AL, Paulo DNS. Subtotal laparoscopic splenectomy in rats with preservation of the inferior pole. *Acta Cir. Bras.* 2011; 26(1): 44-50.
38. Borjaili ASD, Cerqueira BS, Silbermann JR, Rezende CF, Freire Jr DD, Castello JS, Lenz D, Paulo DNS, Nunes TA. Phagocytic function of lower spleen pole and autogenous splenic implants in rats. *Acta Cir. Bras.* 2014; 29(12): 781-6.
39. Paulo ICAL, Paulo DNS, Cintra LC, Santos MCS, Rodrigues H, Ferrari TA, *et al.* Preservative spleen surgery and hiperbaric oxygen therapy. *Acta Cir Bras.* 2007; 22(1):21-8.
40. Paulo ICAL, Paulo DNS, Ferrari TA, Azeredo TCV de, Silva AL. O polo inferior do baço de ratos e a Oxigenoterapia hiperbárica. *Rev Assoc Med Bras.* 2008; 54(1):77-81.
41. Paulo MSL, Paulo ICAL, Nunes TA, Silva AL da, Cintra LC, Paulo DNS. Effect of hyperbaric oxygen therapy in rats with subtotal splenectomy preserving the inferior pole. *Acta Cir Bras.* 2011; 26(3):156-8.

42. Van Diest PJ, Brugal G, Baak JP. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol*. 1998; 51(10):716-24.
43. Rabenhorst SH, Burrini RC, Schimitt FCL. Marcadores de proliferação celular. *Rev Bras Pathol Clin*. 1993; 29(1):24-8.
44. Rabenhorst SH, Burrini RC, Schimitt FCL. Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. *Rev Bras Cancerol*. 1994; 40(3):141-7.
45. Bologna-Molina R, Mosqueda-Taylor A, Molina-Frechero N, Mori-Estevez AD, Sánchez-Acuña G. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013; 18(2):174-9.
46. Oka S, Uramoto H, Shimokawa H, Iwanami T, Tanaka F. The expression of Ki-67, but not proliferating cell nuclear antigen, predicts poor disease free survival in patients with adenocarcinoma of the lung. *Anticancer Res*. 2011; 31(12):4277-82.
47. Mateoiu C, Pirici A, Bogdan F. Immunohistochemical nuclear staining for p53, PCNA, Ki-67 and bcl-2 in different histologic variants of basal cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2011; 52(1):315-9.
48. Salehinejad J, Zare-Mahmoodabadi R, Saghafi S, Jafarian AH, Ghazi N, Rajaei AR, *et al*. Immunohistochemical detection of p53 and PCNA in ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor. *J Oral Sci*. 2011; 53(2):213-7.
49. Madewell BR. Cellular proliferation in tumors: A review of methods, interpretation, and clinical applications. *J Vet Int Med*. 2001; 15(4):334-40.
50. Abadie JJ, Amardeilh MA, Delverdier ME. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 in mast cell tumors from dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 1999; 215(11):1629-34.
51. Quinn CM, Wright NA. The clinical assessment of proliferation and growth in human tumours: evaluation of methods and applications as prognostic variables. *J Pathol*. 1990; 160(2):93-102.
52. Scase TJ, Edwards D, Miller J, Henley W, Smith K, Blunden A, *et al*. Canine mast cell tumors: correlation of apoptosis and proliferation markers with prognosis. *J Vet Int Med*. 2006; 20(1):151-8.
53. de Oliveira MG, Lauxen Ida S, Chaves AC, Rados PV, Sant'Ana Filho M. Immunohistochemical analysis of the patterns of p53 and PCNA expression in odontogenic cystic lesions. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008; 13(5):275-80.
54. de Biasio A, Sánchez R, Prieto J, Villate M, Campos-Olivas R, Blanco FJ. Reduced stability and increased dynamics in the human proliferating cell


- nuclear antigen (PCNA) relative to the yeast homolog. *PLoS One*. 2011; 6(2):e16600.
55. Mighell A. PCNA and p53. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1995; 31B(6):403-4.
 56. Li J, Zhang YP, Kirsner RS. Angiogenesis in wound repair: angiogenic growth factors and extracellular matrix. *Microsc Res Tech*. 2003; 60(1):107-14.
 57. Arai M, Mochida S, Ohno A, Ogata I, Obama H, Maruyama I, *et al*. Blood coagulation equilibrium in rat liver microcirculation as evaluated by endothelial cell thrombomodulin and macrophage tissue factor. *Thromb Res*. 1995; 80(2):113-23.
 58. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 2005; 18(1):4-25.
 59. Celec P, Yonemitsu Y. Vascular endothelial growth factor - basic science and its clinical implications. *Pathophysiology*. 2004; 11(2):69-75.
 60. Ferrara N. Vascular Endothelial Growth Factor: Basic Science and Clinical Progress. *Endocr Rev*. 2004; 25(4):581-611.
 61. Shima DT, Adamis AP, Ferrara N, Yeo KT, Yeo TK, Allende R, *et al*. Hypoxic induction of endothelial cell growth factors in retinal cells: identification and characterization of vascular endothelial growth factor (VEGF) as the mitogen. *Mol Med*. 1995; 1(2):182-93.
 62. Muhonen A, Haaparanta M, Grönroos T, Bergman J, Knuuti J, Hinkka S, *et al*. Osteoblastic activity and neoangiogenesis in distracted bone of irradiated rabbit mandible with or without hyperbaric oxygen treatment. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 33(2):173-8.
 63. Sheikh AY, Rollins MD, Hopf HW, Hunt TK. Hyperoxia improves microvascular perfusion in a murine wound model. *Wound Rep Reg*. 2005; 13(3):303-8.
 64. Peng ZR, Yang AL, Yang QD. The effect of hyperbaric oxygen on intracephalic angiogenesis in rats with intracerebral hemorrhage. *J Neurol Sci*. 2014; 342(1-2):114-23.
 65. Burt JT, Kapp JP, Smith RR. Hyperbaric oxygen and cerebral infarction in the gerbil. *Surg Neurol*. 1987; 28(4):265-8.
 66. Juang JH, Hsu BR, Kuo CH, Uengt SW. Beneficial effects of hyperbaric oxygen therapy on islet transplantation. *Cell Transplant*. 2002; 11(2):95-101.
 67. Costa-Val R, Nunes TA, Oliveira e Silva RC, Souza TK. Hyperbaric oxygen therapy in rats submitted to hepatic veins ligation: mortality valuation and histological study of liver and spleen. *Acta Cir Bras*. 2006; 21(1):1-19.

68. Ijichi H, Taketomi A, Yoshizumi T, Uchiyama H, Yonemura Y, Soejima Y, *et al.* Hyperbaric oxygen induces vascular endothelial growth factor and reduces liver injury in regenerating rat liver after partial hepatectomy. *J Hepatol.* 2006; 45(1):28-34.
69. Uwagawa T, Unemura Y, Yamazaki Y. Hyperbaric oxygenation after portal vein embolization for regeneration of the predicted remnant liver. *J Surg Res* 2001; 100(1):63-8.
70. Nagamine K, Kubota T, Togo S, Nagashima Y, Mori M, Shimada H. Beneficial effect of hyperbaric oxygen therapy on liver regeneration after 90% hepatectomy in rats. *Eur Surg Res.* 2004; 36(6):350-6.
71. Paulo DNS, Kalil M, Grillo Júnior LSP, Borges EB, Cintra LC, Pereira FEL, *et al.* Viabilidade do baço após a ligadura dos vasos esplênicos: efeito do tratamento com oxigênio hiperbárico. *Rev Assoc Med Bras.* 2005; 51(1):46-50.
72. Paulo MSL, Santos FTB, Rocha PG, Silva MB, Cintra LC, Motta LL, *et al.* Immunoexpression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in spleen of splenectomized rats with preservation of inferior pole, submitted to hyperbaric oxygenation. *Acta Cir Bras.* 2013; 28(10):691-695.
73. Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LM, *et al.* Procedimentos Experimentais. *In: Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação.* São Paulo: CLR Balieiro. 2004; 46- 69.
74. Iazzetti PE. Oxigenoterapia hiperbárica em feridas crônicas ou de alto risco: reestabelecimento e potencialização da regeneração em lesões refratárias específicas. *In: Jorge AS, Dantas, SRPE. Abordagem multiprofissional do tratamento de feridas.* São Paulo (SP): Atheneu; 2003.
75. Lacerda EP, Sitnoveter EL, Alcantara LM, Leite JL, Trevizan MA, Mendes IAC. Atuação da enfermagem no tratamento com oxigenoterapia hiperbárica. *Rev Latino-am Enferm.* 2006; 14(1):118-23.
76. Rocha FP, Fagundes DJ, Jefferson AP, Rocha FST. Does hyperbaric oxygenation have a protective effect on random skin flaps? An immunohistochemical study of cellular apoptosis and vascular endothelial growth factor. *Rev Bras Cir Plást.* 2013; 28(2):183-90.
77. Ozden TA, Uzun H, Bohloli M, Toklu AS, Paksoy M, Simsek G, *et al.* The effects of hyperbaric oxygen treatment on oxidant and antioxidants levels during liver regeneration in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2004; 203(4):253-65.
78. Gill AL, Bell CAN. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJMed.* 2004; 97(7):385-95.
79. Costa-Val R, Nunes TA, Silva RC, Souza AF, Souza IE, Souza TK. Inhibition of rats extramedullary liver erythropoiesis by hyperbaric oxygen therapy. *Acta Cir Bras.* 2007; 22(2):137-41.

80. Otali D, Stockard CR, Oelschlager DK, Wan W, Manne U, Watts SA, *et al.* Combined effects of formalin fixation and tissue processing on immunorecognition. *Biotech Histochem.* 2009; 84(5):223-47.
81. Zhang F, Oswald T, Lin S, Cai Z, Lei M, Jones M, *et al.* Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and effect of exogenous VEGF on survival of random flap in the rat. *Br J Plast Surg.* 2003; 56(7):653-9.
82. Moreschi D Jr, Fagundes DJ, Hernandez L, Haapalainen EF. Effects of prostaglandin E(1) in the genesis of blood capillaries in the ischemic skeletal muscle of rats: ultrastructural analysis. *Ann Vasc Surg.* 2008; 22(1):121-6.
83. Zheng Y, Yi C, Xia W, Ding T, Zhou Z, Han Y, *et al.* Mesenchymal stem cells transduced by vascular endothelial growth factor gene for ischemic random skin flaps. *Plast Reconstr Surg.* 2008; 121(1):59-69.
84. Morisaki Y, Shima S, Yoshizumi Y, Sugiura Y, Tanaka S, Tamai S. PCNA immunostaining combined with agnor staining in esophageal squamous cell carcinoma to identify patients with a poor prognosis. *SurgToday. Jpn J Surg.* 1995; 25(5):389-95.
85. Koh SL, Tan JW, Muralidharan V, Christophi C. The effect of hyperbaric oxygen on apoptosis and proliferation in severe acute pancreatitis. *HPB.* 2009; 11(8):629-37.
86. Ayvaz S, Aksu B, Kanter M, Uzun H, Erboga M, Colak A, *et al.* Preventive effects of hyperbaric oxygen treatment on glycerol-induced myoglobinuric acute renal failure in rats. *J Mol Histol.* 2012; 43(2):161-9.
87. Tolentino EC, Castro e Silva O, Zucoloto S, Souza ME, Gomes MC, Sankarankutty AK, *et al.* Effect of hyperbaric oxygen on liver regeneration in a rat model. *Transplant Proc.* 2006; 38(6):1947-52.
88. Idetsu A, Suehiro T, Okada K, Shimura T, Kuwano H. Hyperbaric oxygenation promotes regeneration of biliary cells and improves cholestasis in rats. *World J Gastroenterol.* 2011; 17(17):2229-6.
89. Esposito JP, Camargo RS, Filho AL, Di Loreto C, Kanamura CT, Tolosa EMC. Immunohistoche expression of markers PCNA, Ki-67 e p53 in squamous cell carcinomas of upper aerodigestive tract. *Rev Col Bras Cir.* 2000; 27(5):1-7.

9 ANEXOS E APÊNDICE

ANEXO A – Parecer ético EMESCAM




EMESCAM

Tradição e Conhecimento em Saúde

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 006/2011, relativo ao projeto intitulado “**Análise da Expressão da Expressão Gênica e Proteica do Polo Inferior Remanescente da Esplenectomia Subtotal em Ratos Submetidos à Oxigenoterapia Heperbárica**”, que tem responsável **Danilo Nagib Salomão Paulo** está de acordo com os princípios Éticos da Experimentação Animal, Adotados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-EMESCAM), tendo sido aprovado na reunião ordinária de 26/05/2011. Este certificado expira-se em 26/05/2015

We hereby certify that the Protocol nº 006/2011, related to the project entitled “**Analysis of Protein and Gene Expression of the Remaining Inferior Pole From the Subtotal Splenectomy in Rats Submitted Hyperbaric Oxygen Therapy**”, under the supervision of **Danilo Nagib Salomão Paulo**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA-EMESCAM), and was approved in 26/05/2011.



Marcela Souza Lima Paulo
Coordenadora Adjunta do CEUA-EMESCAM

ANEXO B – Parecer ético UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
- C E T E A -

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo CEUA nº 207/2012**, relativo ao projeto intitulado "**Análise da expressão gênica e proteica do polo inferior remanescente da esplenectomia em ratos submetidos à oxigenoterapia hiperbárica**", que tem como responsável(is) **Tarcizo Afonso Nunes**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **26/09/2012**.

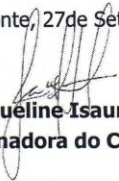
Este certificado expira-se em **26/09/ 2017**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol CEUA nº 207/2012**, related to the project entitled "**Analysis of protein and gene expression of the remaining inferior pole from the splenectomy in rats submitted hyperbaric oxygen therapy**", under the supervisors of **Tarcizo Afonso Nunes**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **September 26 2012**.

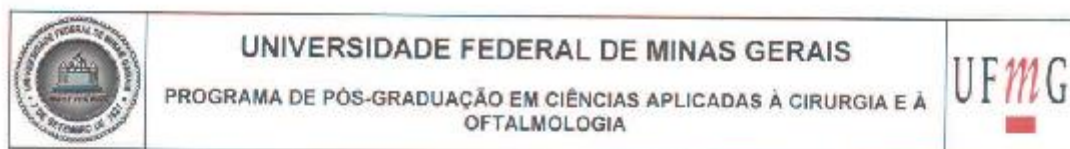
This certificate expires in **September 26, 2017**.

Belo Horizonte, 27 de Setembro de 2012.


Profª. Jacqueline Isaura Alvarez-Leite
Coordenadora do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpg.ufmg.br

ANEXO C – Ata da Defesa



ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA MARCELA SOUZA LIMA PAULO

Realizou-se, no dia 25 de maio de 2015, às 14:00 horas, Faculdade de Medicina da UFMG sala 340, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *EXPRESSÃO DE KI-67, PCNA E VEGF NO POLO INFERIOR DO BAÇO DE RATOS SUBMETIDOS À ESPLENECTOMIA SUBTOTAL COM E SEM EXPOSIÇÃO À OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA*, apresentada por MARCELA SOUZA LIMA PAULO, número de registro 2011657401, graduada no curso de CIÊNCIAS BIOLÓGICAS, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Tarcizo Afonso Nunes - Orientador (UFMG), Prof(a). Danilo Nagib Salomão Paulo - Coorientador (EMESCAM), Prof(a). Andy Petroianu (UFMG), Prof(a). Vivian Resende (UFMG), Prof(a). Flávia Imbroisi Valle Errera (EMESCAM), Prof(a). kalil Mitre (EMESCAM).


A Comissão considerou a tese:

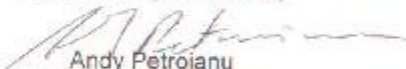
Aprovada

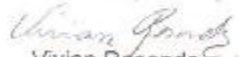
Reprovada

Ata aprovada, assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 25 de maio de 2015.


 Tarcizo Afonso Nunes
 Prof. Titular (UFMG)


 Danilo Nagib Salomão Paulo
 Prof. Titular (EMESCAM)

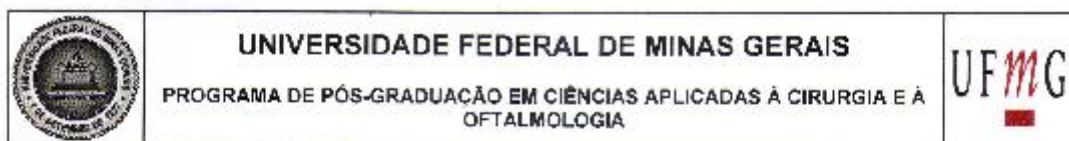

 Andy Petroianu
 Prof. Titular (UFMG)


 Vivian Resende
 Profª Associada (UFMG)


 Flávia Imbroisi Valle Errera
 Profª Celetista (EMESCAM)


 kalil Mitre
 Prof. Adjunto (EMESCAM)

ANEXO D – Folha de Aprovação




FOLHA DE APROVAÇÃO

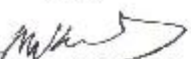
EXPRESSÃO DE KI-67, PCNA E VEGF NO POLO INFERIOR DO BAÇO DE RATOS SUBMETIDOS À ESPLENECTOMIA SUBTOTAL COM E SEM EXPOSIÇÃO À OXIGENAÇÃO HIPERBÁRICA


MARCELA SOUZA LIMA PAULO

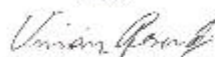
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, área de concentração RESPOSTA INFLAMATÓRIA À AGRESSÃO


Aprovada em 25 de maio de 2015, pela banca constituída pelos membros:


 Prof(a). Marcelo Afonso Nunes - Orientador
 UFMG


 Prof(a). Danilo Negib Salomão Paulo
 EMESCAM


 Prof(a). Arlley Petrolana
 UFMG


 Prof(a). Vivian Resende
 UFMG


 Prof(a). Flávia Imbroisi Valle Lacerda
 EMESCAM


 Prof(a). Kallil Viana
 EMESCAM

Belo Horizonte, 25 de maio de 2015.

APÊNDICE A - Artigo

1 – ORIGINAL ARTICLE
MODELS, BIOLOGICAL**Immunoexpression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in spleen of splenectomized rats with preservation of inferior pole, submitted to hyperbaric oxygenation¹****Marcela Souza Lima Paulo^I, Filipy Taifson Barbosa dos Santos^{II}, Polyanna Gonçalves Rocha^{III}, Mirella de Barros Silva^{IV}, Luiz Cálce Cintra^V, Luciene Lage da Motta^{VI}, Flávia Imbroisi Valle Errera^{VII}, Danilo Nagib Salomão Paulo^{VIII}, Tarcizo Afonso Nunes^{IX}**^IFellow PhD degree, Postgraduate Program in Surgical and Ophthalmological Applied Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte-MG, Brazil. Intellectual and scientific content of the study, acquisition and interpretation of data, manuscript preparation.^{II}Graduate student, Pharmacy, College of Health Sciences, EMESCAM, Vitoria-ES, Brazil. Acquisition and interpretation of data, manuscript preparation.^{III}Graduate student, Pharmacy, College of Health Sciences, EMESCAM, Vitoria-ES, Brazil. Interpretation of data.^{IV}Graduate student, Pharmacy, College of Health Sciences, EMESCAM, Vitoria-ES, Brazil. Acquisition and interpretation of data, manuscript preparation.^VPhD, Associate Professor, College of Health Sciences, EMESCAM, Vitoria-ES, Brazil. Analysis and interpretation of data.^{VI}MD, Pathologist, Santa Casa de Misericórdia de Vitória Hospital, Brazil. Analysis and interpretation of data.^{VII}Associate Professor, Department of Morphology, College of Health Sciences, EMESCAM, Vitoria-ES, Brazil. Intellectual and scientific content of the study, manuscript preparation, critical revision.^{VIII}PhD, Chairman, Full Professor, Department of Surgery, College of Health Sciences, EMESCAM, Vitoria-ES, Brazil. Conception, design, intellectual and scientific content of the study; statistical analysis; manuscript writing; critical revision.^{IX}PhD, Chairman, Full Professor, Department of Surgery, Medical School, UFMG, Belo Horizonte-MG, Brazil. Manuscript writing, critical revision.**PURPOSE:** To analyze PCNA immunoexpression on the inferior pole of the spleen of splenectomized rats submitted to hyperbaric oxygenation (HBO).**METHODS:** Were analyzed fragments of the inferior pole of the spleen of 20 male Wistar rats submitted to splenectomy with preservation of the inferior pole. The rats were divided in two groups: group A (n=10) without HBO and group B (n=10) submitted to HBO at 2, 5 atmospheres per 120 minutes, twice a day for three days and once a day for seven days. The groups were then subdivided in four subgroups: A15 (n=5), with euthanasia on the 15th day; A45 (n=5), with euthanasia on the 45th day; B15 (n=5) with euthanasia on the 15th day and B45 with euthanasia on the 45th day. Respectively on these days, fragments of the inferior pole of the spleen of all animals were collected and analyzed with the immunohistochemistry technique in order to evaluate PCNA expression.**RESULTS:** There was an expressive increase in PCNA immunoreactivity in the group B. The 45 day postoperative period resulted in a higher level of positivity than the 15 day postoperative period (p<0.01).**CONCLUSION:** The quantitative analysis of proliferating cell nuclear antigen positive suggests that hyperbaric oxygenation increases cellular proliferation, contributing to splenic regeneration.**Key words:** Proliferating Cell Nuclear Antigen. Hyperbaric Oxygenation. Splenectomy. Rats.

Introduction

For a long time the spleen was considered a non-essential organ to life, and its removal suggested that it caused no serious damage to the patient¹. In the last decades, however, it was confirmed that splenectomy in children and adults results in high mortality in the postoperative period caused by fulminating sepsis². Infectious complications were also observed in experimental animals³. For these reasons, conservative spleen surgeries were again taken into account. Subtotal splenectomy with inferior pole preservation (ESTPI) in which blood irrigation is maintained by the vessels of the gastrosplenic ligament is one of the most recently described.

The investigation of the inferior pole of the spleen of dogs and rats⁴⁻⁶ submitted to ESTPI showed alterations in the viability of the remaining tissue, in the immediate postoperative period. Rats submitted to this procedure, followed by hyperbaric oxygenation (HBO) at 100% pure oxygen, in conventional microscopy, showed larger lymphatic follicles, increase of the amount of cells and vessels and more lymphocytic cell proliferation in the inferior pole of the spleen^{7,8}. Considering these findings, we proposed to evaluate the immunohistochemistry expression (IHC) of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA) which main function is to increase the activity of delta DNA polymerase during DNA replication, event that precedes cell division process⁹. In this context, PCNA investigation might contribute to a better comprehension of the cellular processes that occur during the growth and proliferation of the inferior pole of the spleen after HBO.

Methods

This study was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation (n° 004/08-CETEA) of the Federal University of Minas Gerais, Brazil. The study was conducted at the Laboratory of IHC of Research Center EMESCAM in collaboration with the Laboratory of Cellular and Molecular Biology of Human Cancer of the Federal University of Espirito Santo, Brazil (UFES).

Study design

Twenty male Wistar rats submitted to ESTPI were used in this study. The animals were randomly divided in two groups according to whether they were submitted or not to HBO and were later subdivided in four groups according to the day of specimen collection of the inferior pole of the spleen for IHC analysis⁸ (Table 1).

TABLE 1 – Distribution of rats in two groups according to the use of hyperbaric oxygenation and in four subgroups according to the postoperative day when the collection of specimens of the spleen inferior pole (n=20) was done.

Groups	Subgroups - day of specimen collection	Number of spleen tissue fragments
Without HBO (n=10)	A15 – 15 th day (n=5)	n=5
	A45 – 45 th day (n=5)	n=5
With HBO (n=10)	B15 – 15 th day (n= 5)	n=5
	B45 – 45 th day (n=5)	n=5

Surgical procedure and hyperbaric oxygenation

The animals were anesthetized with 75mg/Kg ketamine chloridrate (Vetaset®, Fort Lodge – Iowa, USA) associated with 5mg/Kg of xylazine chloridrate (Kensol® König – Avellaneda, Argentina) via intraperitoneal injection. Next, the rats were submitted to laparotomy for the realization of ESTPI which remained irrigated by the vessels of the gastrosplenic ligament⁴. The spleen superior portion was removed according to Paulo *et al.*¹⁰. After the end of the anesthetic effect, the animals in group B were submitted to HBO in an appropriate chamber, according to what was established in the protocol¹⁰: gradual compression up to 2, 5 atmospheres, being 1 atm at sea level and 1.5 atm registered at the chamber manometer, maintained at this pressure for 90 minutes, followed by gradual decompression of the chamber for 25 minutes. This procedure was carried out twice a day for three days and once a day for seven days.

Specimen collection from the inferior pole of the spleen and euthanasia

The twenty rats were submitted to a new laparotomy on the 15th and 45th postoperative day, according to the subgroup, for the collection of specimen from the spleen inferior pole, followed by euthanasia (Table 1). The splenic fragments were fixed on neutral-buffered formalin 10% (pH 7.0) and sent to the laboratory of anatomical pathology.

Immunoeexpression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in spleen of splenectomized rats with preservation of inferior pole, submitted to hyperbaric oxygenation

Immunohistochemistry analysis

The specimens collected from the inferior pole of the spleen were kept in formalin for 24-48 hours and processed in paraffin for IHC analysis. Sections were cut at 3mm thickness and placed on pre-treated glass slides (AutoFrost® - CancerDiagnostic - United States of America). Immunostaining was done by anti-PCNA primary antibody (Mouse monoclonal [PC-10] to PCNA, BSA and Azide free [ab80576] - Abcam®).

For the IHC procedure, glass slides were: deparaffinized with xylol at room temperature twice at 10 minutes each; hydrated in 100% ethanol, 95% ethanol, 80% ethanol and distilled water; antigenic recuperation: heating the slides in 10mmol/L citrate buffer pH 6.0 at 98°C for 30 minutes; maintained at room temperature for thirty minutes and washed in phosphate-buffered saline (PBS); washed in 0% fat free powder milk to decrease the background and incubated in wet chamber for 30 minutes; incubated with 300 µL of primary antibody PCNA solution diluted 1:200 in wet chamber for two hours; washed with PBS; incubated in wet chamber with eight drops of secondary antibody (Histofine® - Nichirei - cod.414191f) in room temperature for 30 minutes; washed in PBS; incubated with 3mL of peroxidase inhibitor (H₂O₂ 3%) at room temperature for five minutes; washed with PBS; incubated in wet chamber with diaminobenzidine solution (DAB) at room temperature for five minutes; washed with distilled water; stained with 1 mL Harris' hematoxylin for two minutes; washed with distilled water; immersed in 5% ammonium hydroxide in order to obtain blue nucleus and brown cytoplasm; washed in distilled water; dehydrated in alcohol and xylol and mounted with coverslips using Canada Balsam.

A slide with a spleen section was used as negative control (Figure 1A) without using the specific antibody and, as positive control (Figure 1B) with human amygdala fragments. The positive nuclei presented brownish or yellowish coloration and were considered positive, no matter the staining intensity.

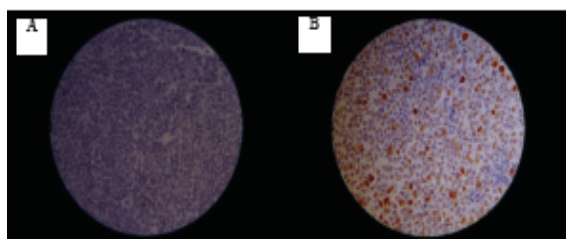


FIGURE 1 – (A) Negative Control – a section of the spleen without brown staining indicating the absence of PCNA (x100) marker. (B) Positive Control – a section of human amygdala with positive PCNA marker, made evident by the brown staining (x100).

Quantitative analysis of PCNA expression was done in optical microscope. The pathologist chose the most representative areas with x100 augmentation (immersion). The level of positivity was determined by the formula described below⁶:

$$\text{Level of positivity} = \frac{\text{Number of positive cells}}{\text{Number of counted cells}} \times 100$$

Data was represented by median. The difference between the groups was evaluated with the non-parametric Mann Whitney test and $p < 0.05$ was considered significant.

Results

PCNA was immunopositive in all subgroups with a varying positivity level between 53.0% and 84.0%. Among the subgroups which were not submitted to hyperbaric oxygenation, there was no difference in the positivity level. However, there was a difference of positivity level among the groups of animals submitted or not to hyperbaric oxygenation. In the groups which were not treated, there was no difference in positivity level. B15 subgroup (Figure 2A) presented a positivity level higher than that of A15 ($p < 0.01$ (Figure 2B) and the same difference was observed between the groups A45 and B45 ($p < 0.01$). 45 days of postoperative resulted in higher level of positivity than that of 15 days, only in animals submitted to hyperbaric oxygenation ($p < 0.01$) (Table 2).

TABLE 2 - The cellular proliferation of the inferior pole of rats submitted to ESTPI treated and those non-treated with hyperbaric oxygen in the 15th day of postoperative period and in the 45th day of postoperative period.

Group	Subgroup	Cellular proliferation		P ₁	P ₂
		IP	M		
A	A15	53.5%	535.40	NS	<0.01
	A45	53.0%	550.40		
B	B15	71.5%	715.00	<0.01	<0.01
	B45	84.0%	841.00		

M - Median; IP - Positivity index; NS - Non Significant. (Mann's Whitney Test)
 p₁ - Comparison between subgroups A15 and A45 and subgroups B15 and B45
 p₂ - Comparison between subgroups A15 and B15 and between subgroups A45 and B45

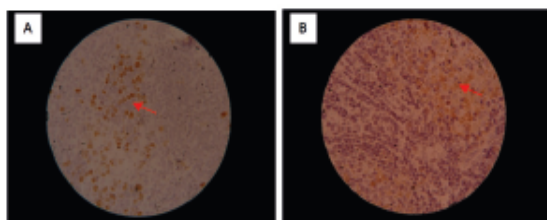


FIGURE 2 - (A) There is a greater number of PCNA-positive cells (indicated by the arrow) in a section of a treated animal spleen – B15 (x100). (B) There is a small number of PCNA-positive cells in a section of a non-treated animal spleen – A15 (x100).

Discussion

Many experimental studies have been conducted in order to better understand the biological properties of hyperbaric oxygenation. Among the most used markers to assess cell proliferation PCNA stands out, and its immune expression has been investigated in many studies. In this study, a significant difference was noted in PCNA immunoeexpression in the group treated with HBO.

HBO is used in the treatment of many inflammatory diseases and ischemic conditions such as wounds, carbon monoxide intoxication and acute necrotic infection¹². The increase of oxygen dissolution in the blood causes oxygenation in hypoxic areas¹². HBO increases free radical generation that oxidizes membrane proteins and lipids and inhibits bacterial metabolic functions. Hyperoxia in normal tissues causes fast significant vasoconstriction which is compensated by the increase of oxygen transportation in the plasma and the micro-vascular blood flow in the ischemic tissue is effectively improved¹⁶. In conventional histologic analysis, Costa-Val *et al.*¹⁹ did not find spleen and liver cellular proliferation in rats submitted to HBO at 2, 5 atm for 90 minutes in 20 consecutive days, but found a significant reduction of extra medullary hepatic eritropoiesis¹⁷.

There are no reports in the literature on the evaluation of spleen cellular proliferation after HBO using PCNA. In order to understand the effects of this therapy on spleen regeneration references on the regeneration of other organs were considered, especially those on liver regeneration.

Although there was a decrease in renal tissue necrosis, HBO did not increase PCNA immunoeexpression, due probably to insufficient HBO time at 2, 5 atm (2 days for 90 minutes)¹¹.

Many authors¹²⁻¹⁴ have studied the effect of HBO in liver regeneration in rats after 70% hepatectomy using PCNA to evaluate proliferative activity. There was an increase in cellular

proliferation with a positivity index varying from 4% to 69% in treated groups and of 1, 4% to 50% in non-treated groups. Pressure in these groups varied from 2.0 to 2.8 atm, being 2.5 atm the most used.

The great variety of protocols described may confirm differences in positivity index found in many studies. These protocols include continuous treatment for many days; however, there are reports in which HBO effects are observed in a few hours after the beginning of treatment¹⁸. This is the reason why most recent studies investigate HBO effects between 24-48 hours of postoperative period. It is possible that studies on gene expression will help to understand the effects of early HBO.

Conclusion

The quantitative analysis of proliferating cell nuclear antigen positive suggests that hyperbaric oxygenation increases cellular proliferation, contributing to splenic regeneration.

References

1. Crosby WH. An historical sketch of splenic function and splenectomy. *Lymphology*. 1983;16(2):52-5.
2. King H, Shumacker Jr HB. Splenic studies. Susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. *Ann Surg*. 1952;136(2):239-42.
3. Morris DH, Bullock FD. The importance of the spleen in resistance to infection. *Ann Surg*. 1919;70(5):513-21.
4. Paulo DNS, Lázaro da Silva A, Cintra LC, Bof AM, Santiago DC, Ribeiro GB. Esplenectomia subtotal, em cães, com preservação do pólo inferior suprido por vasos do ligamento gastroesplênico. *Rev Col Bras Cir*. 1999;26(3):147-52.
5. Paulo DNS, Paulo ICAL, Kalil M, Vargas PM, Lázaro da Silva A, Baptista JFA, Guerra AJ. Subtotal splenectomy preserving the lower pole in rats: technical, morphological and functional aspects. *Acta Cir Bras*. 2006;21(5):321-7.
6. Paulo ICAL, Paulo DNS, Cintra LC, Santos MCS, Rodrigues H, Ferrari TA, Azevedo TC, Silva AL. Preservative spleen surgery and hiperbaric oxygen therapy. *Acta Cir Bras*. 2007;22(1):21-8.
7. Paulo ICAL, Silva AL, Piras C, Ramos BF, Zanetti FR, Paulo DNS. Aspectos morfológicos e funcionais dos autoimplantes esplênicos em ratos tratados com oxigênio hiperbárico. *Rev Col Bras Cir*. 2010;37(3):226-33.
8. Paulo MSL, Paulo ICAL, Nunes TA, Silva AL da, Cintra LC, Paulo DNS. Effect of hyperbaric oxygen therapy in rats with subtotal splenectomy preserving the inferior pole. *Acta Cir Bras*. 2010;26(3):156-8.
9. Novellino ATN, Amorim RFB, Queiroz LMG, Freitas RA. Immunoeexpression analysis of PCNA and p53 in oral squamous cell carcinoma: correlation with histological grading of malignancy and clinical features. *Acta Cir Bras*. 2003;18(5):458-6.
10. Paulo DNS, Kalil M, Grillo Junior LSP, Borges EB, Cintra LC, Pereira FEL, Lázaro da Silva A. Viabilidade do baço após a ligadura dos vasos esplênicos: efeito do tratamento com oxigênio hiperbárico. *Rev Assoc Med Bras*. 2005;51(1):46-4.
11. Ayvaz S, Aksu B, Kanter M, Uzun H, Erboğa M, Colak A, Basaran

Immunoeexpression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in spleen of splenectomized rats with preservation of inferior pole, submitted to hyperbaric oxygenation

- UN, Pul M. Preventive effects of hyperbaric oxygen treatment on glycerol-induced myoglobinuric acute renal failure in rats. *J Mol Histol.* 2012;43(2):161-9.
12. Ozden TA, Uzun H, Bohloli M, Toklu AS, Paksoy M, Simsek G, Durak H, Issever H, Ipek T. The effects of hyperbaric oxygen treatment on oxidant and antioxidants levels during liver regeneration in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2004;203:253-12.
 13. Tolentino EC, Castro e Silva O, Zucoloto S, Souza ME, Gomes MC, Sankarankutty AK, Oliveira GR, Feres O. Effect of hyperbaric oxygen on liver regeneration in a rat model. *Transplant Proc.* 2006;38(6):1947-52.
 14. Idetsu A, Suehiro T, Okada K, Shimura T, Kuwano H. Hyperbaric oxygenation promotes regeneration of biliary cells and improves cholestasis in rats. *World J Gastroenterol.* 2011;17(17):2229-6.
 15. Ozdogan M, Ersoy E, Dundar K, Albayrak L, Devay S, Gundogdu H. Beneficial effect of hyperbaric oxygenation on liver regeneration in cirrhosis. *J Surg Res.* 2005;129:260-4.
 16. Gill AL, Bell CAN. Hyperbaric oxygen: its uses, mechanisms of action and outcomes. *QJMed.* 2004;97(7):385-95.
 17. Costa-Val R, Nunes TA, Silva RC, Souza AF, Souza IE, Souza TK. Inhibition of rats extramedullary liver erythropoiesis by hyperbaric oxygen therapy. *Acta Cir Bras.* 2007;22(2):137-4.
 18. Speit G, Demnog C, Radermacher P, Rothfuss A. Genotoxicity of hyperbaric oxygen. *Mutat Res.* 2002;512(2-3):111-9.

Acknowledgements

To Luiz Antônio de Oliveira, technician of the Laboratory of Animal Experimentation of EMESCAM; Rosicléia Marcos de Oliveira, technician of the Pathology Laboratory of EMESCAM; PhD Leticia Rangel, Coordinator of the Cellular and Molecular Biology Human Cancer Laboratory of UFES; Renata Daltoé and Karine Lourenzoni Araújo, PhD students and Aline Ferrari and Raison Antunes, undergraduate students for their technical support during the development of the study. FTBS and PGR had a scholarship of scientific initiation.

Correspondence:

Tarcizo Afonso Nunes
Rua Professor Estevão Pinto, 637/1104 30220-060 Belo Horizonte –
MG Brasil
Tel.: (55 31)3409-9632 / 9983-0110
tan@medicina.ufmg.br

Received: June 12, 2013

Review: Aug 14, 2013

Accepted: Sept 12, 2013

Conflict of interest: none

Financial sources: Foundation for Research Support of the State of Espírito Santo (FAPES) and the Institute for Sustained Development and Practical Actions in the Area of Health (Instituto Solidário)

[†]Research performed at Laboratory of Animal Experimentation, College of Health Sciences (EMESCAM), Vitória-ES, Brazil.