

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA

**EFEITO DO CAMPO ELETROMAGNÉTICO
DINÂMICO APÓS LESÃO TRAUMÁTICA EM
FÍGADO DE RATOS**

MARCELLE SOUZA ALVES DA SILVA

Belo Horizonte
2013

MARCELLE SOUZA ALVES DA SILVA

**EFEITO DO CAMPO ELETROMAGNÉTICO
DINÂMICO APÓS LESÃO TRAUMÁTICA EM
FÍGADO DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Aplicadas à Cirurgia e à Oftalmologia da Faculdade de Medicina de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Área de Concentração: Cicatrização.

Linha de pesquisa: Fatores adjuvantes na cicatrização tecidual.

Orientador: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ivana Duval de Araújo.

Belo Horizonte

Faculdade de Medicina - UFMG

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG

REITOR: Professor Dr. Clélio Campolina Diniz

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO: Professor Dr. Ricardo Santiago Gomez

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Professor Dr. Francisco José Penna

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

CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Coordenador: Professor Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha

COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA E OFTALMOLOGIA

Professor Dr. Marcelo Dias Sanches (**coordenador**)

Professora Dr^a. Ivana Duval de Araújo (**subcoordenador**)

Professor Dr. Alcino Lázaro da Silva

Professor Dr. Márcio Bittar Nehemy

Professor Dr. Renato Santiago Gomez

Professor Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Sumara Marques Barral – representante discente titular

DEDICATÓRIA

À Prof^a. Dr^a. Ivana Duval de Araújo, incentivadora incondicional, cuja visão extraordinária me ajudou a encontrar o caminho mais adequado, o equilíbrio nas atitudes, a coerência nos porquês e a sensatez na lógica e nos sentimentos.

AGRADECIMENTOS

Ao Orientador, **Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes**, pela oportunidade, pela compreensão e por acreditar na viabilidade deste estudo.

A Coorientadora, **Prof^a. Dr^a. Ivana Duval de Araújo**, construtora de conhecimento, pelas orientações, dedicação e incentivo que fizeram deste mestrado uma experiência de vida.

A **Prof^a. Dr^a. Paula Vieira Teixeira Vidigal**, anatomopatologista, por ter abraçado a ideia e possibilitado a realização deste trabalho.

A Nilton Jorge, pela construção da bobina, sua colaboração foi fundamental.

A médica e mestre Simone Vargas Bento, amiga, companheira de estudo, exemplo de dedicação.

A Minha Família, pelo apoio incondicional, incentivo, suporte e, principalmente, pelo amor. A presença de vocês tornou este trabalho possível.

Aos alunos da iniciação científica, **Arthur Paiva Araújo e Cristiane Gomes de Barros Ferreira**, pela contribuição.

A todos aqueles que me apoiaram e incentivaram ao longo dessa árdua jornada.

RESUMO

Introdução: A terapia eletromagnética é um método não-invasivo, seguro e fácil, para reparar vários tecidos lesados, podendo ser uma alternativa no tratamento da lesão hepática secundária ao trauma, que ainda constitui um desafio. **Objetivo:** Determinar os efeitos do campo eletromagnético dinâmico nas alterações histológicas devidas ao trauma hepático em ratos. **Método:** Após padronização de um modelo de lesão hepática, 20 ratas foram submetidas à laparotomia mediana e realizada a lesão do lobo medial esquerdo do fígado, mediante introdução de espátula a um centímetro da borda hepática em ângulo de 90 graus com o parênquima e rotação única de 360 graus do instrumento em torno do seu próprio eixo, seguido de retirada do mesmo e compressão digital por 30 segundos para hemostasia. Após a laparorráfia, os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos: grupo C, controle; grupo E, campo eletromagnético. Os animais do grupo E foram expostos a um campo eletromagnético, imediatamente após a operação, com duas horas de duração, que foram repetidos por mais duas vezes em intervalos de 24 horas, totalizado três ciclos em 72 horas. No terceiro dia de pós-operatório foi realizada relaparotomia e retirada em bloco da região do fígado lesada, que foi avaliada por um observador independente por meio de análise histológica e determinação de área de necrose e área de regeneração. Marcadores de apoptose (ssDNA) e de proliferação celular (Ki67) foram utilizados para a análise imunohistoquímica. Os dados foram considerados significativos para $p < 0,05$. **Resultados:** Não houve diferença entre os grupos com relação à inflamação, fibroplasia, angiogênese e extensão da área de necrose e de regeneração. Na área de necrose não houve diferença significativa na expressão de Ki67 e ssDNA. Entretanto, na área de regeneração houve maior expressão de Ki67 no grupo E ($25,8 \pm 10,7$ vs. $13,8 \pm 5,9$, $p=0,007$), sem diferença na expressão de ssDNA. **Conclusão:** O uso do campo eletromagnético dinâmico em ratos com lesão traumática do fígado promoveu maior proliferação celular na área de regeneração hepática, mas não contribuiu para modificar as alterações histológicas, assim como as áreas de necrose e de regeneração do parênquima hepático.

Palavras-chave: Campo eletromagnético. Regeneração hepática. Lesão hepática.
Trauma hepático.

ABSTRACT

Introduction: The bioeffects that electromagnetic fields (EMF) have on tissues have been reported in several studies, although the effects of electromagnetic therapy on cellular repair process have not been completely elucidated. Despite scientific evidence, the use of EMF on liver injury requires further studies. This experimental study was carried out to evaluate the effect of EMF and to provide further support for its therapeutic use in liver injury. **Material and Methods:** A total of 20 female 2-month-old *Wistar* albino rats, randomly assigned to two groups, the control group (C) and EMF group (E), were used. All animals underwent operation and a standard injury was made in the hepatic medial lobe. The E group was exposed to three cycles of EMF. Two hours of electromagnetic therapy was administered to the animals immediately after surgery, and thereafter given every 24 h. Hematoxylin and eosin staining was made to carry out histological studies, and Ki67 and ssDNA staining was employed to carry out immunohistochemical analyses. **Statistical Analysis:** Group results for quantitative variables were compared using Student's t-test. The results for qualitative variables were analyzed using chi-squared test. For all statistical analyses, the level of significance was set at 0.05. **Results:** Severe inflammation, moderate to severe fibroplasia, moderate to severe angiogenesis, necrosis extension area, and regeneration extension area were not different between the groups. In the area of necrosis, there was no significant difference in the expression of Ki67 and ssDNA. In the area of regeneration, there was no significant difference in the expression of ssDNA, but a higher expression of Ki67 was observed in the E group, when compared with that in the C group (25.8 ± 10.7 vs. 13.8 ± 5.9 , $p=0.007$). **Conclusion:** Electromagnetic therapy in hepatic injury resulted in increased cell proliferation (Ki67) in the area of regeneration. Although histological findings revealed no differences between the groups. Given the potential benefits, research involving the impact of the influence of electromagnetism in pathophysiological mechanisms and cellular liver should be encouraged.

Keywords: Electromagnetic field. Liver regeneration. Liver injury. Hepatic trauma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figuras

FIGURA 1 - Bobina geradora do campo eletromagnético com multímetro ligado.....	22
FIGURA 2 - Identificação do lobo hepático medial esquerdo.....	23
FIGURA 3 - Introdução de espátula puntiforme (afastador de cutícula) a um centímetro da borda hepática em ângulo de 90 graus com o parênquima.	24
FIGURA 4 - Rotação de 360 graus em torno do eixo da espátula.....	24
FIGURA 5 - Lesão hepática.....	25
FIGURA 6 - Rato no interior da bobina.....	26
FIGURA 7 - Identificação de lesão hepática após relaparotomia.....	27
FIGURA 8 - Amostras fixadas em formaldeído 10% identificadas por numeração individual.....	27
FIGURA 9 - Fotomicrografia de corte histológico corado em HE (200x) mostrando área central de necrose hepática circundada por área de regeneração em animal do grupo estudo.....	32
FIGURA 10 - Fotomicrografia de corte histológico (400x) mostrando expressão de ssDNA nas áreas de necrose e regeneração em animal do grupo estudo.....	33
FIGURA 11 - Fotomicrografia de corte histológico (400x) mostrando expressão de Ki67 na área de necrose em animal do grupo estudo.....	34
FIGURA 12 - Fotomicrografia de corte histológico (1000x) mostrando presença de mitose (expressão de Ki67) na área de regeneração em animal do grupo estudo.....	36

Gráficos

GRÁFICO 1 - Média do número de células expressando ssDNA na área de necrose em lesão traumática do fígado de animais controle (C) e submetidos ao campo eletromagnético (E).....	33
GRÁFICO 2 - Média do número de células expressando Ki67 na área de necrose em lesão traumática do fígado de animais controle (C) e submetidos ao campo eletromagnético (E).....	35
GRÁFICO 3 - Média do número de células expressando ssDNA na área de regeneração em lesão traumática do fígado de animais controle (C) e submetidos ao campo eletromagnético (E).....	36
GRÁFICO 4 - Média do número de células expressando Ki67 na área de regeneração em lesão traumática do fígado de animais controle (C) e submetidos ao campo eletromagnético (E).....	37

Quadros

QUADRO 1 - Graduação das alterações histológicas para avaliar a morfologia do parênquima hepático.....	28
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Comparação entre número de animais do grupo C (n=10) e do grupo E (n=9) quanto às características histológicas.....	31
TABELA 2 - Comparação entre número de animais do grupo C (n=10) e do grupo E (n=9) quanto à presença de áreas de necrose ou regeneração....	32
TABELA 3 - Comparação entre animais do grupo C (n=10) e do grupo E (n=9) quanto à positividade para ssDNA.....	34
TABELA 4 - Comparação entre animais do grupo C (n=10) e do grupo E (n=9) quanto à positividade para Ki67.....	35

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVO.....	15
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	16
3.1 Regeneração hepática.....	16
3.2 Eletromagnetismo.....	17
3.3 Bioefeitos do eletromagnetismo.....	17
3.4 Marcadores bioquímicos de regeneração hepática.....	18
4 MATERIAIS E MÉTODO.....	20
4.1 Delineamento da pesquisa.....	20
4.2 Campo eletromagnético.....	21
4.3 Procedimentos anestésicos e cirúrgicos.....	22
4.3.1 Posição dos animais na mesa cirúrgica e anestesia.....	22
4.3.2 Lesão hepática.....	23
4.4 Pós-operatório.....	25
4.5 Exposição ao campo eletromagnético dinâmico.....	25
4.6 Eutanásia e coleta de material.....	26
4.7 Avaliação histológica.....	28
4.8 Avaliação imunoistoquímica.....	29
4.9 Variáveis estudadas e testes estatísticos.....	30
5 RESULTADOS.....	31
6 DISCUSSÃO.....	38

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.

7 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS.....	43
ANEXOS.....	48

1 INTRODUÇÃO

O trauma constitui uma doença crescente em todo o mundo, correspondendo à quinta causa de mortalidade e morbidade abaixo dos 60 anos. Aproximadamente 5,8 milhões de pessoas morrem a cada ano vítimas de trauma, e projeta-se um aumento para 8,4 milhões em 2020 (PÄUN *et al.*, 2011). As causas externas de morbidade e mortalidade compreendem as lesões decorrentes de acidentes (relacionados ao trânsito, afogamento, envenenamento, quedas ou queimaduras) e de violências (agressões, homicídios, suicídios, tentativas de suicídio, abusos físicos, sexuais e psicológicos) e impõem-se como importante desafio às autoridades de saúde pública. No Brasil, as causas externas representam a terceira causa mais frequente de morte, responsáveis por 124.956 óbitos em 2010, ocupando a primeira posição na faixa etária de um a 39 anos (MASCARENHAS *et al.*, 2010; BRASIL, 2011).

As lesões hepáticas correspondem a 5% das admissões nas salas de urgência (STRACIERI *et al.*, 2006). A localização anatômica do fígado e o seu tamanho o tornam mais susceptível ao trauma contuso e, frequentemente, ao trauma penetrante (BATHEN, 2005). A mortalidade no trauma hepático atinge níveis de 35% a 80% nas lesões graves. As mortes são resultado de hemorragia incontrolada, complicações infecciosas pós-operatórias, extensão das lesões associadas e disfunção orgânica de múltiplos sistemas (STALHSCHMIDT *et al.*, 2008). Diante deste cenário, a abordagem do trauma hepático constitui-se em desafio para os profissionais de saúde. O tratamento não-operatório do trauma hepático contuso, desde que o paciente apresente estabilidade hemodinâmica, tornou-se a primeira opção nos grandes centros de trauma (VELMAHOS *et al.*, 2003; STRACIERI *et al.*, 2006; DRUMOND e VIEIRA, 2009). Dentre as poucas lesões abdominais penetrantes, que permitem tratamento não cirúrgico, as do fígado representam a maioria (RENZ *et al.*, 1994).

O processo de regeneração hepática nas lesões traumáticas desse órgão tem sido foco de estudos, sobretudo aqueles relacionados aos mecanismos de regeneração de hepatócitos e os processos que estariam associados à sua aceleração ou retardo (JESUS *et al.*, 2000; PETROIANU *et al.*, 2004; TANNURI *et*

al., 2007; FAUSTO *et al.*, 2006; KUNG *et al.*, 2009).

A relação entre o eletromagnetismo e reparo celular tem sido tema de pesquisas experimentais em cicatrização de feridas cutâneas, anastomoses intestinais e fraturas ósseas (BULLOCK *et al.*, 2007; FUNK *et al.*, 2009; NURSAL *et al.*, 2006; GRANA *et al.*, 2008; BORSATO, 2009; PATRUNO *et al.*, 2010). Entretanto, estudos sobre terapias que aceleram a regeneração hepática ainda são escassos (OTTANI *et al.*, 1984). Esse fato nos motivou a pesquisar sobre o uso do campo eletromagnético na regeneração hepática.

2 OBJETIVO

Avaliar os efeitos do campo eletromagnético dinâmico nas alterações histológicas, áreas de necrose e de regeneração hepática em ratos submetidos ao trauma hepático.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Regeneração hepática

A reparação de tecidos lesados envolve todo um complexo sistema de células e mediadores que abrange as seguintes etapas básicas: fase inflamatória, fase proliferativa, que inclui angiogênese, fibroplasia e epitelização, e por último, a fase de maturação. Em termos biológicos, regeneração significa a reconstituição de uma estrutura que foi excisada, a partir do coto de amputação. Contudo, a regeneração hepática constitui-se de um processo distinto, em que tecnicamente ocorre um processo de crescimento compensatório do tecido lesado (FAUSTO *et al.*, 2006). O hepatócito, principal célula do fígado, possui natureza epitelial altamente diferenciada e, em condições normais, raramente se divide (RAMALHO *et al.*, 1993; PETROIANU *et al.*, 2004). Entretanto, a proliferação hepatocitária pode ser estimulada em resposta às condições que induzem perda celular (PETROIANU *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2007). Em animais a perda de parênquima hepático normal por injúria química, viral ou trauma resulta em processo regenerativo, cujo objetivo final é a restauração do parênquima hepático danificado (RAMALHO, 2000; OLIVEIRA, 2007). Essa restauração, que ocorre de maneira regulada e precisa, consiste no aumento do tamanho das células hepáticas (hipertrofia compensatória) associado à divisão e multiplicação celular (hiperplasia) (PETROIANU *et al.*, 2004; FAUSTO *et al.*, 2006; AGUIAR *et al.*, 2011).

O processo de regeneração hepática é dividido em três fases (FAUSTO *et al.*, 2006; AGUIAR *et al.*, 2011). No estágio inicial, que ocorre seis horas após a lesão e atinge seu máximo 24 a 30 horas após o trauma, os hepatócitos adquirem a capacidade de replicação. Em um segundo estágio, ocorre rápida fase de divisão celular buscando uma quantidade adequada de células para restituição da função. Essa proliferação inicia-se na região peri-portal depois do intervalo de 24 horas e continua na região peri-central durante 36 a 48 horas. Após 72 horas, a histologia hepática se caracteriza por grupos de hepatócitos com vascularização

rudimentar. Em sete dias, uma estrutura lobular típica está formada, porém com lóbulos aumentados de volume, que serão remodelados para o tamanho normal. Durante o estágio de terminação, que dura aproximadamente 15 dias, a divisão celular diminui progressivamente e as mitoses se tornam menos evidentes (OLIVEIRA, 2007; AGUIAR *et al.*, 2011).

3.2 Eletromagnetismo

A teoria do eletromagnetismo foi desenvolvida por vários físicos durante o século XIX, culminando finalmente no trabalho de James Maxwell, o qual unificou as pesquisas anteriores em uma única teoria para explicar a relação entre a eletricidade e o magnetismo. Essa teoria baseia-se no conceito da existência de um campo eletromagnético gerado por meio do movimento de cargas elétricas. A variação do fluxo magnético resulta em um campo elétrico, sendo esse fenômeno conhecido como indução magnética. O campo eletromagnético é representado pelo número de linhas de fluxo por unidade de área que permeiam o campo e é expresso em Tesla (T) no Sistema Internacional de Unidades. O número e a maneira como os elétrons estão organizados nos átomos constituintes dos diversos materiais é que explicarão o comportamento das substâncias quando estão sobre a influência de um campo eletromagnético (MÁXIMO *et al.*, 2011).

O campo magnético ao redor da Terra é de aproximadamente 10^{-5} T e dos aparelhos de ressonância magnética entre 1,5 e 8 T (FUNK, 2009). Em estudos experimentais envolvendo os bioefeitos do eletromagnetismo, as densidades dos campos magnéticos variam entre 0,2 microTesla e 20 miliTesla, um intervalo que abrange condições de campo eletromagnético encontradas em uma série de ambientes domésticos e profissionais (CRIDLAND *et al.*, 1999).

3.3 Bioefeitos do eletromagnetismo

Todos os sistemas de um organismo, do nível molecular ao dos órgãos, estão em constante movimento com suas cargas elétricas gerando campos eletromagnéticos, em geral de baixa frequência. Tem-se demonstrado que vários tipos de células são capazes de mudar sua direção de movimento natural em até 180° quando submetida à determinados campos eletromagnéticos. Uma teoria

que tenta explicar a orientação perpendicular que assumem as células, quando induzidas a um campo eletromagnético, está relacionada com a interação de proteínas de adesão e seus receptores (FUNK *et al.*, 2009).

As descrições do uso terapêutico do campo eletromagnético são antigas. No primeiro século depois de Cristo encontram-se relatos do uso de peixes elétricos para o tratamento de cefaléia e gota. Posteriormente, Paracelsus (1493-1542) estudou o uso medicinal de pedras-imã e Kenelm Digby (1603-1665) descreveu o poder de cura de feridas por meio do magnetismo (FUNK *et al.*, 2009). Estudos experimentais em ratos mostraram os efeitos benéficos do eletromagnetismo no tratamento de fraturas ósseas, na cicatrização de anastomoses intestinais e na regeneração do fígado (GRANA *et al.*, 2008; NURSAL *et al.*, 2006; BORSATO, 2009; OTTANI *et al.*, 1984). Além disso, observou-se que fibroblastos expostos a pulsos eletromagnéticos apresentaram aumento significativo no número de mitoses (CRIDLAND *et al.*, 1999). Estudos atuais têm demonstrado cada vez mais os efeitos benéficos do campo eletromagnético na cicatrização e regeneração de tecidos. Entretanto, os mecanismos moleculares específicos envolvidos nesse processo ainda não estão esclarecidos (ASSIOTIS *et al.*, 2012; JUSZCZAK *et al.*, 2012).

3.4 Marcadores bioquímicos de regeneração hepática

O processo de regeneração hepática pode ser avaliado por meio de diferentes métodos como peso do fígado, contagem mitótica, componentes do DNA, índice de síntese de antígenos nucleares avaliados por imunistoquímica, expressão de genes, variação nos níveis de proteínas séricas, testes sorológicos, determinações enzimáticas de marcadores de proliferação e citometria de fluxo. Dentre os marcadores bioquímicos, o anti-Ki67 e o anti-ssDNA são largamente utilizados. O Ki67 é um antígeno nuclear marcador de proliferação, associado a todas as fases do ciclo celular. Pode ser visto precocemente na fase G₁ e apresenta picos durante as fases S e M do ciclo celular. É detectado mediante coloração com imunoperoxidase, utilizando-se um anticorpo monoclonal de ratos. O ssDNA é um antígeno marcador de apoptose celular que reage com o DNA de fita simples dos núcleos celulares. Também é detectado por meio de coloração

com imunoperoxidase, utilizando-se anticorpo monoclonal de coelhos. As vantagens do uso desses marcadores se encontram na reprodutibilidade e aplicabilidade do método e em sua correlação com outros índices de proliferação celular como incorporação de timidina e citometria de fluxo (ASSY e MINUK, 1997; MORINAGA *et al.*, 2005).

4 MATERIAIS E MÉTODO

4.1 Delineamento da pesquisa

O projeto desta pesquisa foi aprovado pela Câmara Departamental do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da UFMG e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CETEA) (nº269/10, ANEXOS A e B). Foram estudadas 20 ratas da linhagem *Wistar*, com média de dois meses de idade e peso variando de 250 a 280 gramas, provenientes do biotério do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os animais foram mantidos no Núcleo de Experimentação Animal da Faculdade de Medicina da UFMG e, após período de adaptação, o experimento foi realizado. No período pré-operatório, as ratas permaneceram alojadas, em grupos de cinco em cada gaiola de polipropileno, com maravalhas selecionadas, mamadeira para líquidos e cocho para ração. As gaiolas eram acondicionadas no interior de gabinetes ventilados e com exaustão, que proporcionavam fotoperíodos de 12 horas de luminosidade e escuridão por meio de um temporizador previamente programado. No pós-operatório, os animais foram acondicionados em gaiolas individuais. Água foi ofertada *ad libitum* e ração na proporção média de 10 gramas por 100 gramas de peso corporal por dia para cada animal. Todos os animais foram submetidos à laparotomia mediana, seguida de lesão hepática e distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos:

Grupo C - (controle) - composto por 10 animais identificados individualmente de C1 a C10, que não foram expostos ao campo eletromagnético dinâmico.

Grupo E - (campo eletromagnético) - composto por 10 animais identificados individualmente de E1 a E10, que foram expostos ao campo eletromagnético.

Após três dias da primeira intervenção cirúrgica, os animais foram submetidos à eutanásia, por meio de injeção intraperitoneal de superdose de anestésico, relaparotomizados pela mesma incisão e realizada ressecção do

parênquima hepático, que foi encaminhado para análise histológica e imunoistoquímica.

4.2 Campo Eletromagnético

A bobina fornecedora do campo eletromagnético foi desenvolvida segundo modelo criado pelo Professor Doutor Cláudio de Souza e Professor Mestre Luiz Henrique Silva Borsato em parceria com engenheiros eletricitistas da Faculdade de Engenharia da Universidade Federal de Juiz de Fora. Ela foi construída enrolando-se um fio de cobre revestido por verniz com 0,57 mm no formato cilíndrico homogêneo ao redor de um tubo de cloreto de polivinil de 39,5 cm de comprimento e 15,5 cm de diâmetro, totalizando 4140 espiras (voltas ao redor do tubo) distribuídas em seis camadas de 690 espiras, construindo-se uma bobina (FIG. 1). Conectando-se esse aparelho em uma tomada da rede elétrica, a energia transmitida através da bobina cria um campo eletromagnético. A tensão da fonte era de 127 Volts e a frequência da corrente, 60 Hertz (dados da empresa fornecedora). Utilizando-se um multímetro, verificou-se que o valor da corrente através da bobina foi 0,35 Ampéres. A intensidade do campo eletromagnético foi de 4,62 miliTesla, conforme calculado pela equação:

$$\text{Intensidade: } \frac{M_0 \times N \times i}{L}$$

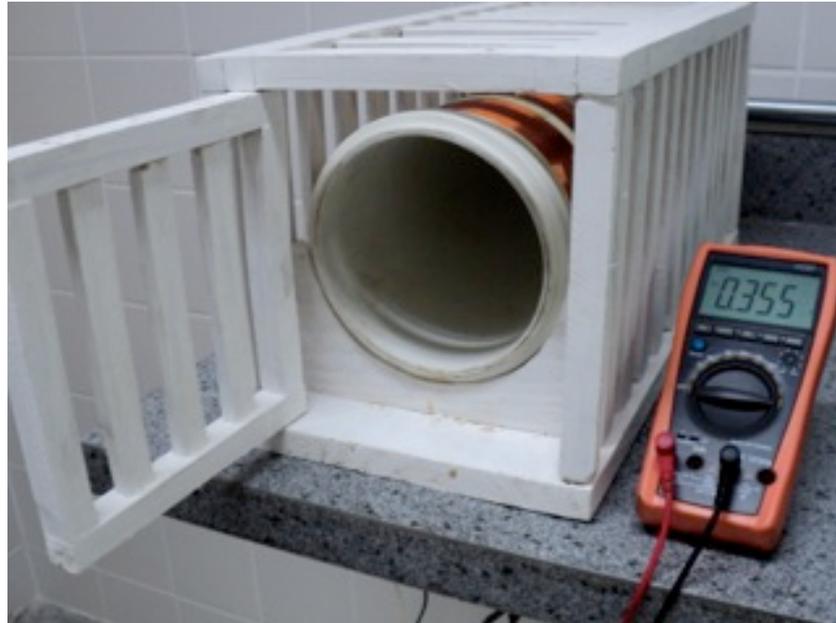
M_0 : permeabilidade magnética no vácuo ($1,26 \times 10^{-6}$ Henry/metro)

N: número de espiras

i: corrente (Ampéres)

L: comprimento (metro)

FIGURA 1 - Bobina geradora do campo eletromagnético no interior de gaiola de madeira com multímetro ligado



4.3 Procedimentos anestésicos e cirúrgicos

4.3.1 Posição dos animais na mesa cirúrgica e anestesia

Os animais foram transferidos individualmente à sala do experimento e, após contenção manual, foram anestesiados com cloridrato de cetamina 10% na dose de 70 mg/Kg e cloridrato de xilazina 2% na dose de 10 mg/Kg por via intramuscular. Uma vez alcançado o nível anestésico, os animais foram submetidos aos procedimentos seguintes: posição de decúbito dorsal na mesa cirúrgica, com fixação de suas patas à mesa pelo uso de tiras de esparadrapo e antissepsia da região abdominal com clorexidina degermante.

4.3.2 Lesão hepática

O procedimento teve início com laparotomia mediana de dois centímetros a partir do apêndice xifóide. Após a colocação de afastador autoestático procedeu-se o pinçamento da borda hepática para tração e identificação do lobo medial esquerdo. Nesse lobo foi realizada a lesão mediante introdução de espátula (afastador de cutícula) a um centímetro da borda hepática em ângulo de 90 graus com o parênquima e rotação única de 360 graus do instrumento em torno do seu próprio eixo, seguido de retirada do mesmo e compressão digital por 30 segundos para hemostasia. Procedeu-se à retirada do afastador autoestático e fechamento da aponeurose e pele por meio de sutura contínua com mononáilon 4-0 em plano único. (FIG. 2-5).

FIGURA 2 - Identificação do lobo hepático medial esquerdo (seta)

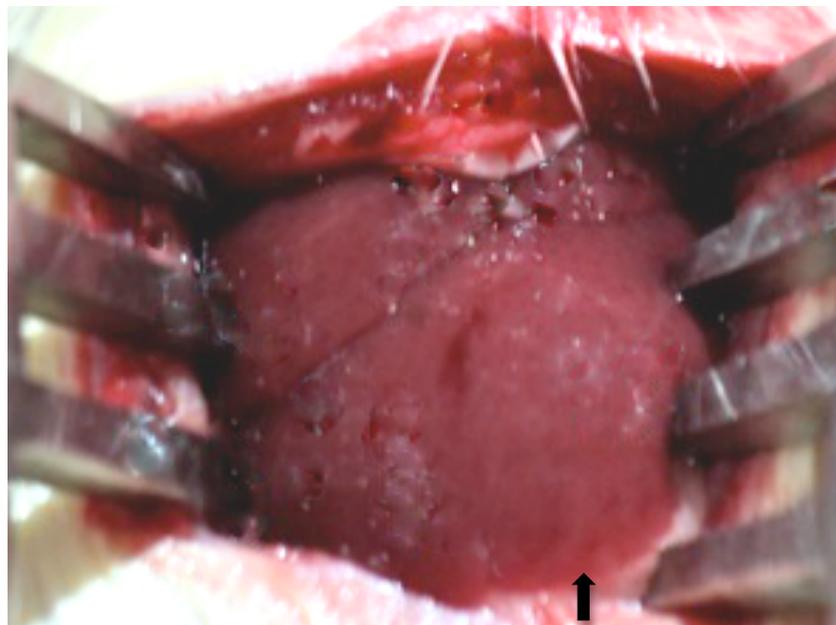


FIGURA 3 - Introdução de espátula puntiforme (afastador de cutícula) a um centímetro da borda hepática em ângulo de 90 graus com o parênquima

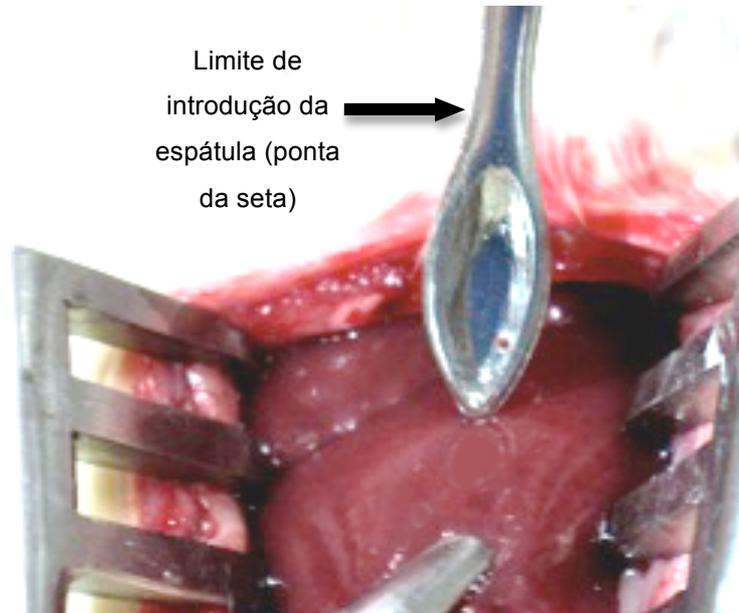


FIGURA 4 - Rotação de 360 graus em torno do eixo da espátula

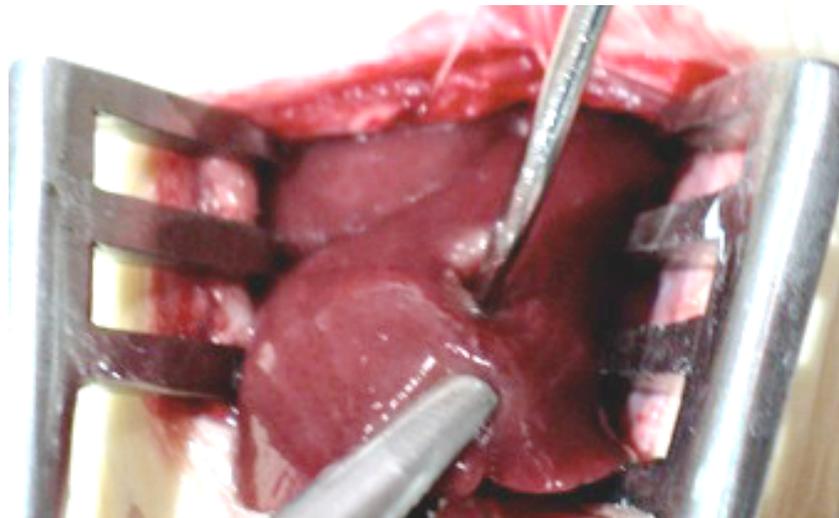
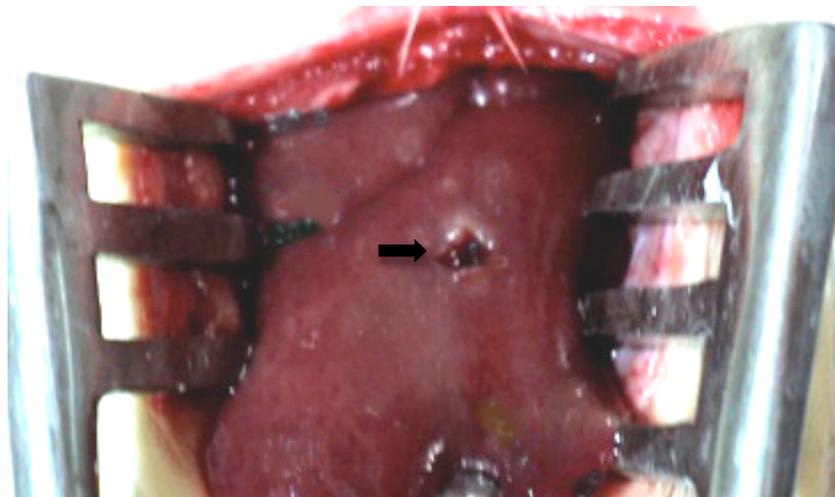


FIGURA 5 - Lesão hepática (seta)



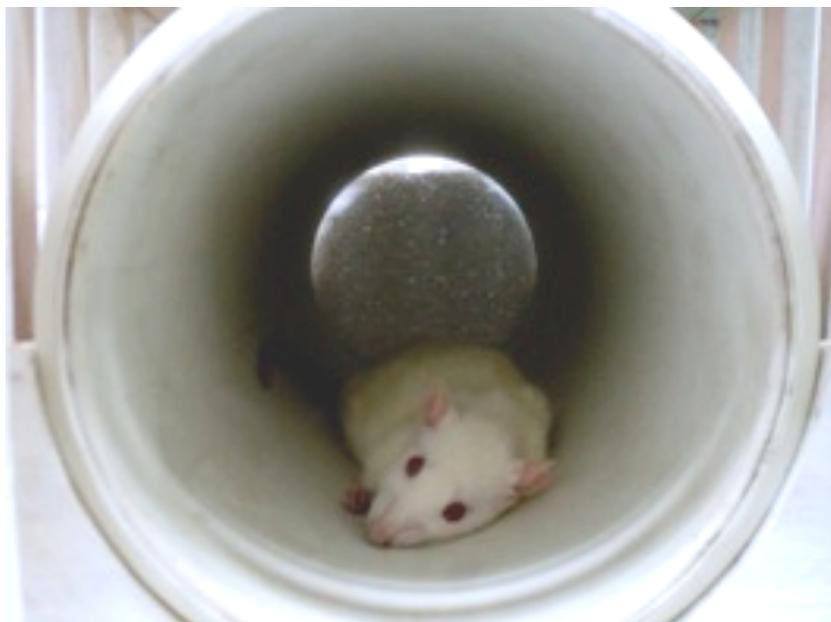
4.4 Pós-operatório

Os animais do grupo C foram alojados em gaiolas individuais até a recuperação anestésica e, em seguida, transferidos para as gaiolas de origem. Os animais do grupo E, após exposição ao campo eletromagnético dinâmico, foram alojados em suas respectivas gaiolas. Todos os animais receberam dipirona sódica na dose de 20 mg/Kg dissolvida em água e administrada de forma contínua, além de ração industrial (*Presence* ratos e camundongos[®], Empresa *Presence* nutrição animal).

4.5 Exposição ao campo eletromagnético dinâmico

Imediatamente após o término da operação de lesão hepática, os animais do grupo E foram acondicionados individualmente no interior da bobina e submetidos por duas horas ao primeiro ciclo de exposição ao campo eletromagnético. Cada animal deste grupo repetiu o mesmo procedimento por mais duas vezes com intervalo de 24 horas, completando-se três ciclos (FIG. 6).

FIGURA 6 - Rato no interior da bobina



4.6 Eutanásia e coleta de material

No terceiro dia de pós-operatório, os animais dos dois grupos foram submetidos à eutanásia por meio de injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina 10% na dose de 210 mg/Kg e cloridrato de xilazina 2% na dose de 30 mg/Kg, o que corresponde a três vezes a dose anestésica habitual. Os ratos foram relaparotomizados pela incisão prévia e a área do fígado em que havia sido realizada a lesão foi identificada e fotografada (FIG. 7). Seguiu-se a coleta de um centímetro quadrado do parênquima hepático incluindo a lesão. As amostras foram identificadas por um observador independente, mediante numeração individual sem identificação dos grupos, fixação em formaldeído a 10% e enviadas para anatomia patológica (FIG. 8).

FIGURA 7 - Identificação de lesão hepática após relaparotomia (seta)

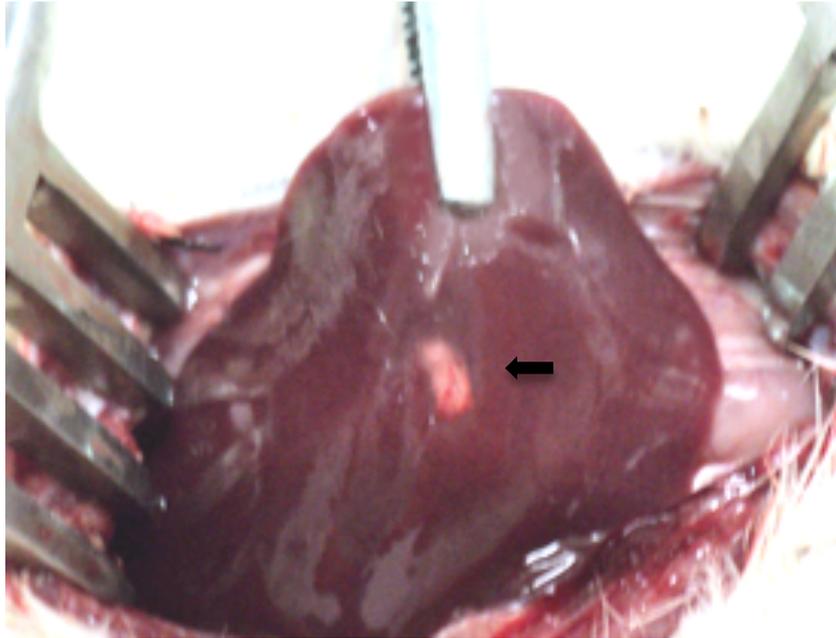


FIGURA 8 - Amostras fixadas em formaldeído 10% identificadas por numeração individual



4.7 Avaliação histológica

Amostras de fígado fixadas em formol a 10% foram incluídas em blocos de parafina a partir dos quais foram feitas lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE), que foram avaliadas por anatomopatologista que não conhecia a que grupo os animais pertenciam. A morfologia do parênquima hepático foi avaliada por microscopia de luz quanto a presença de inflamação, angiogênese, fibroplasia, sendo graduadas segundo os critérios descritos no quadro 1.

Considerou-se ausência desses parâmetros quando as células com estas características não estavam presentes ou se encontravam em número reduzido.

QUADRO 1 - Graduação das alterações histológicas para avaliar a morfologia do parênquima hepático

Classificação histológica		Graduação
Inflamação	0	Ausente
	1	Leve (células gigantes, ocasionais linfócitos e células plasmáticas)
	2	Moderada (células gigantes, células plasmáticas, eosinófilos e neutrófilos)
	3	Acentuada (numerosas células inflamatórias)
Angiogênese	0	Ausente
	1	Leve (proliferação vascular isolada ou rara)
	2	Moderada (proliferação vascular presente)
	3	Acentuada (proliferação vascular intensa)
Fibroplasia	0	Ausente
	1	Leve (fibroblastos isolados ou raros)
	2	Moderada (fibroblastos presentes)
	3	Acentuada (fibroblastos em grande número)

4.8 Avaliação imunoistoquímica

Para realização da técnica de imunoistoquímica foram feitos novos cortes a partir dos blocos de parafina agora em lâminas silanizadas. Esses cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol. A seguir, foram mergulhados em solução de EDTA 1mM (pH 8,0), e aquecidos a 96^oC em vaporizador *steamer* por 30 minutos, para a recuperação antigênica. Após resfriamento e lavagem dos cortes em tampão TRIS, Tris-HCl 0,05M (pH 7,6), eles foram tratados com solução de H₂O₂ a 3%, fundamental na inativação da peroxidase endógena. Nova lavagem com TRIS foi feita para que, em seguida, os cortes fossem incubados com os anticorpos primários anti-Ki67 (DakoCytomation, Estados Unidos) diluído a 1:500 e ssDNA (DakoCytomation, Estados Unidos) diluído a 1:100. Para controle negativo da imunomarcação, foi utilizado apenas TRIS. Essa incubação durou doze horas e foi mantida a 4^oC em câmara úmida. Após lavagem em TRIS, as secções foram expostas à solução pós-primária, kit NovoLinkTM Max Polymer (Novocastra, Reino Unido). Nova lavagem precedeu a exposição dos cortes ao polímero, kit NovoLinkTM Max Polymer, fundamental para a amplificação da resposta. A imunorreacção foi visualizada usando diaminobenzidina - DAB, kit Liquid DAB + Substrate Chromogen System (DakoCytomation, Estados Unidos), que foi preparada de acordo com as orientações do fabricante. Ao final, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Harris, desidratados, diafanizados e montados.

Todos os cortes foram examinados em microscópio de luz (Modelo KF2, Zeiss, GE), com aumento de 400x para quantificar imunoexpressão das proteínas. As colorações para Ki67 e ssDNA foram avaliadas pelo mesmo patologista. Foram consideradas positivas as células que apresentaram núcleo com coloração castanha, como resultado da precipitação do cromógeno diaminobenzidina, independente da intensidade da coloração. Foram contados todos os hepatócitos marcados nas áreas centrais de necrose e de regeneração circunjacente.

4.9 Variáveis estudadas e testes estatísticos

O cálculo amostral foi determinado pelo teste para duas proporções por meio do pacote estatístico Minitab®15. Considerando-se 80% para o poder de prova, 0,05 para o alfa e uma diferença de 60% entre a resposta esperada para os métodos apresentados, obteve-se um número mínimo de sete animais por grupo de estudo.

A comparação dos dados obtidos pela análise anatomopatológica foi realizada por meio do teste de Fisher no programa *Epi Info*TM7. Os dados obtidos pela análise imunoistoquímica foram comparados por meio do pacote estatístico Minitab®15 empregando-se o teste t de Student. Considerou-se como diferentes as comparações quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Durante o processo de preparação do material uma amostra de parênquima hepático do grupo E foi perdida. Portanto, a análise dos resultados foi realizada considerando-se 10 animais para o grupo C, controle, e nove animais para o grupo E, submetidos ao campo eletromagnético.

Na região da lesão hepática, a inflamação classificada como acentuada foi identificada em três (30,0%) dos animais do grupo C e seis (66,7%) dos animais do grupo E, sem diferença entre os grupos ($p=0,127$). A angiogênese moderada a acentuada foi vista em seis (60,0%) dos animais do grupo C e cinco (55,6%) dos animais do grupo E, sem diferença entre ambos ($p=0,605$). Observou-se fibroplasia moderada a acentuada em um (10,0%) animal do grupo C e em três (33,3%) dos animais do grupo E, sem diferença entre ambos ($p=0,249$) (TAB. 1).

TABELA 1 - Comparação entre número de animais do grupo C (n=10) e do grupo E (n=9) quanto às características histológicas

Grupo de animais	Característica histológica		
	Inflamação	Angiogênese	Fibroplasia
Controle	3 (30,0%)	6 (60,0%)	1 (10,0%)
Eletromagnético	6 (66,7%)	5 (55,6%)	3 (33,3%)

(inflamação $p=0,127$; angiogênese $p=0,605$; fibroplasia $p=0,249$) teste de Fisher – *Epi Info*TM7.

À histologia, observou-se que a extensão da necrose não foi diferente entre os grupos (FIG. 9). A necrose classificada como extensa foi vista em nove animais do grupo C (90,0%) e sete (77,8%) do grupo E ($p=0,458$) (TAB. 2). A regeneração classificada como extensa foi identificada em um animal do grupo C (10,0%) e quatro (44,4%) do grupo E ($p=0,119$) (TAB. 2).

FIGURA 9 - Fotomicrografia de corte histológico corado em HE (200x) mostrando área central de necrose hepática (seta maior) circundada por área de regeneração (seta menor) em animal do grupo estudo

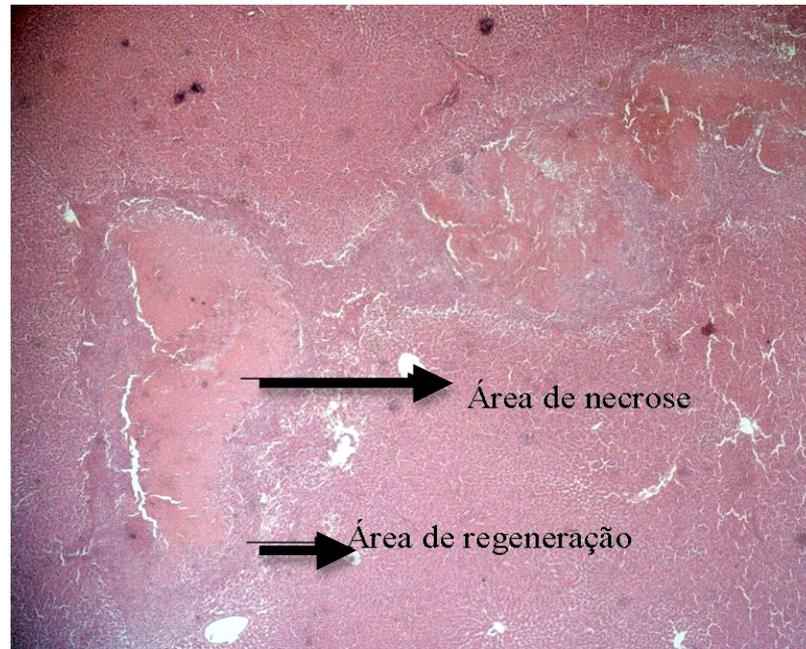


TABELA 2 - Comparação entre número de animais do grupo C (n=10) e do grupo E (n=9) quanto à presença de áreas de necrose ou regeneração

Grupo de animais	Área	
	Necrose	Regeneração
Controle	9 (90,0%)	1 (10,0%)
Eletromagnético	7 (77,8%)	4 (44,4%)

(necrose $p=0,458$; regeneração $p=0,119$) teste de Fisher – *Epi Info*TM7.

Na área de necrose, a apoptose, quantificada pelo número de células expressando ssDNA, foi de $9,2 \pm 4,7$ células no grupo C e $11,0 \pm 9,7$ células no grupo E, sem diferença entre os grupos ($p=0,631$) (FIG. 10) (GRÁF. 1) (TAB. 3). A proliferação celular nessa área, quantificada pelo número de células expressando o Ki67, foi de $26,5 \pm 15,1$ células no grupo C e $36,6 \pm 11,4$ no grupo E, sem diferença entre os grupos ($p=0,123$) (FIG. 11) (GRÁF. 2) (TAB. 4).

FIGURA 10 - Fotomicrografia de corte histológico (400x) mostrando expressão de ssDNA na área de necrose em animal do grupo estudo (setas)

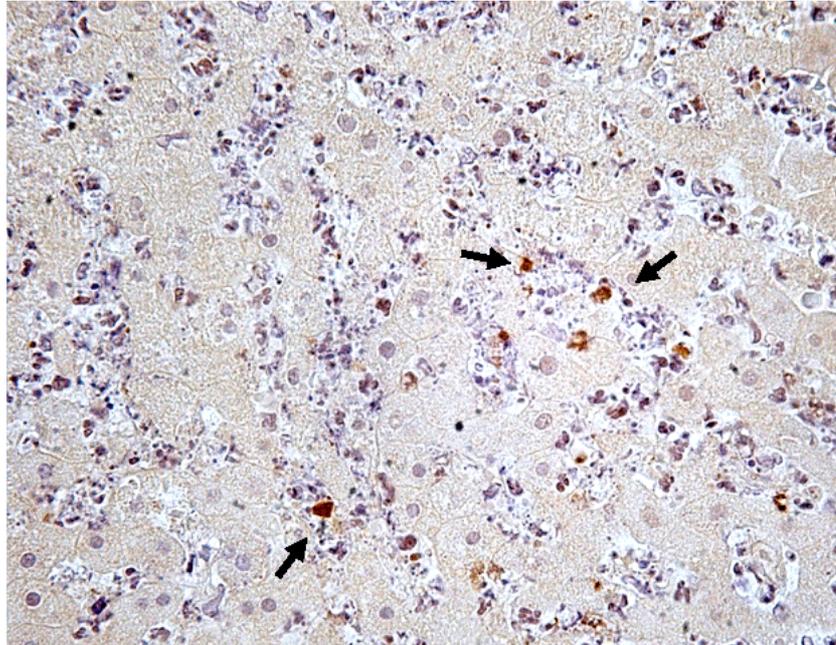


GRÁFICO 1 – Média do número de células expressando ssDNA na área de necrose em lesão traumática do fígado de animais controle (C) e submetidos ao campo eletromagnético (E)

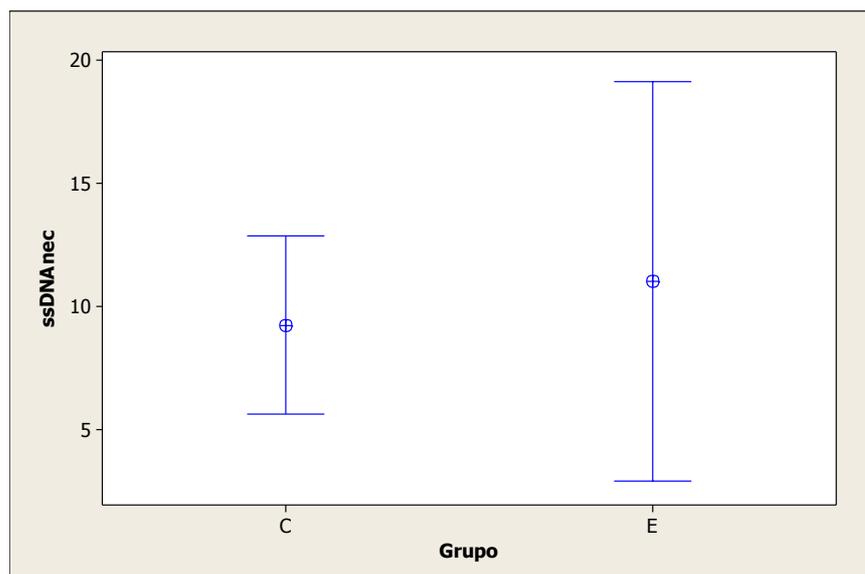


TABELA 3 - Comparação entre animais do grupo C (n=10) e do grupo E (n=9) quanto à positividade para ssDNA

Grupos de animais	ssDNA (apoptose)	
	Área de necrose	Área de regeneração
Controle	9,2 ± 4,7	5,4 ± 1,7
Eletromagnético	11,0 ± 9,7	6,0 ± 2,1

(necrose $p= 0,631$; regeneração $p=0,557$) teste T Student – Minitab®15.

FIGURA 11 - Fotomicrografia de corte histológico (400x) mostrando expressão de Ki67 nas áreas de necrose e regeneração (setas) em animal do grupo estudo

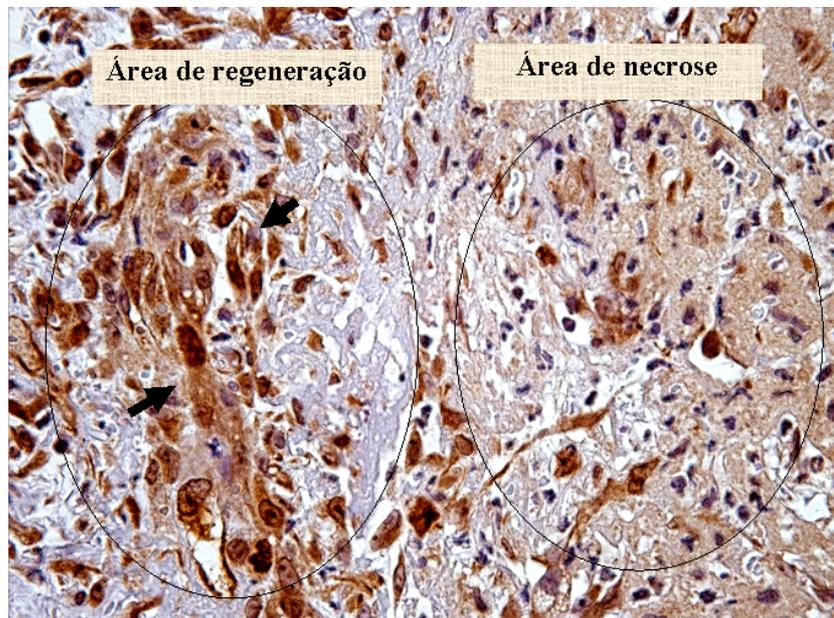


GRÁFICO 2 – Média do número de células expressando Ki67 na área de necrose em lesão traumática do fígado de animais controle (C) e submetidos ao campo eletromagnético (E)

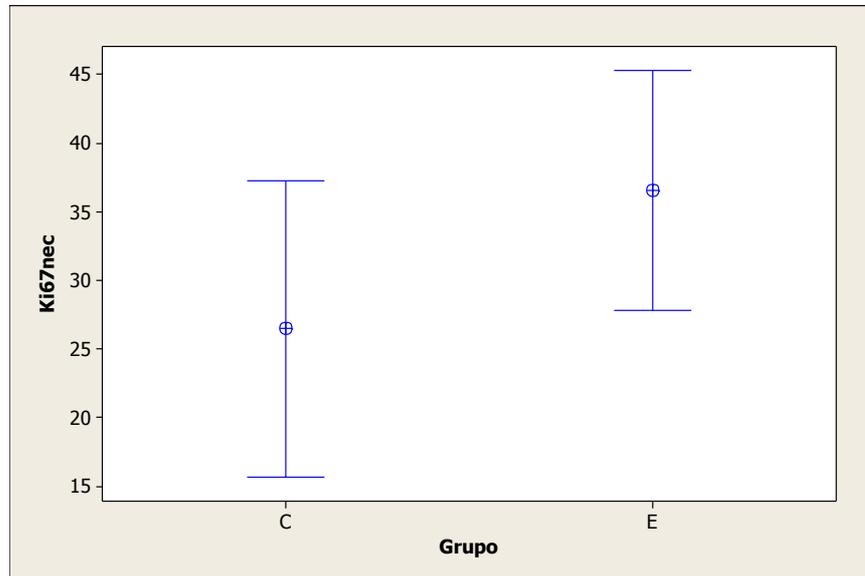


TABELA 4 - Comparação entre animais do grupo C (n=10) e do grupo E (n=9) quanto à positividade para Ki67

Grupos de animais	Ki67 (proliferação celular)	
	Área de necrose	Área de regeneração
Controle	26,5 ± 15,1	13,8 ± 5,9
Eletromagnético	36,6 ± 11,4	25,8 ± 10,7

(necrose $p=0,123$; regeneração $p=0,007$) teste T Student – Minitab®15.

Na área de regeneração, a apoptose, quantificada pelo número de células expressando o ssDNA, foi de $5,4 \pm 1,7$ células no grupo C e $6,0 \pm 2,1$ células no grupo E, sem diferença entre os grupos ($p=0,557$) (GRÁF. 3) (TAB. 3). Já a proliferação celular, quantificada pelo número de células expressando o Ki67, foi de $13,8 \pm 5,9$ células no grupo C e $25,8 \pm 10,7$ no grupo E, com diferença entre os grupos ($p=0,007$) (FIG. 12) (GRÁF. 4) (TAB. 4).

GRÁFICO 3 – Média do número de células expressando ssDNA na área de regeneração em lesão traumática do fígado de animais controle (C) e submetidos ao campo eletromagnético (E)

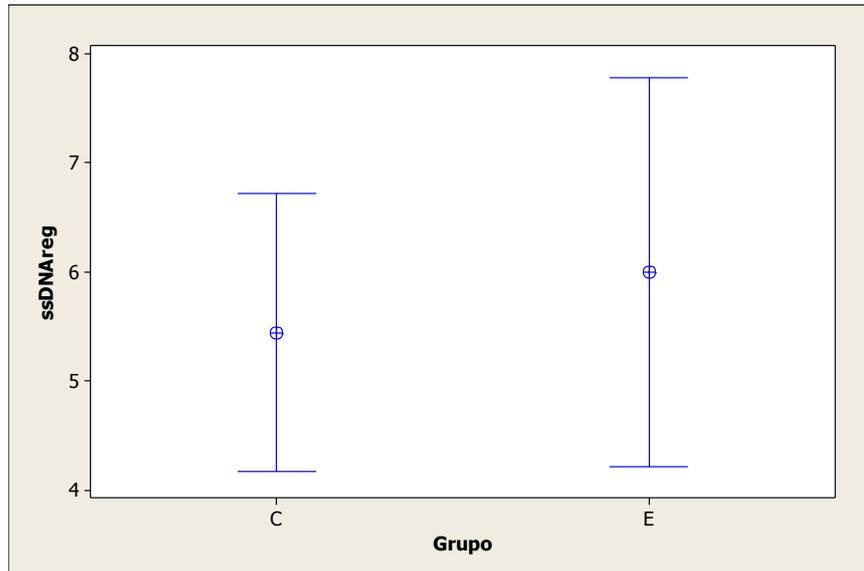


FIGURA 12 - Fotomicrografia de corte histológico (1000x) mostrando presença de mitose (expressão de Ki67) na área de regeneração em animal do grupo estudo (seta)

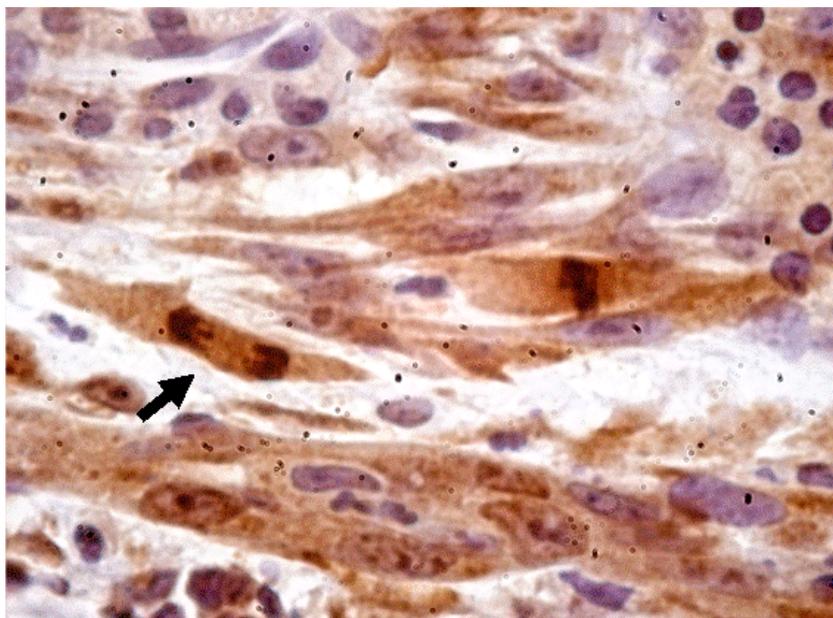
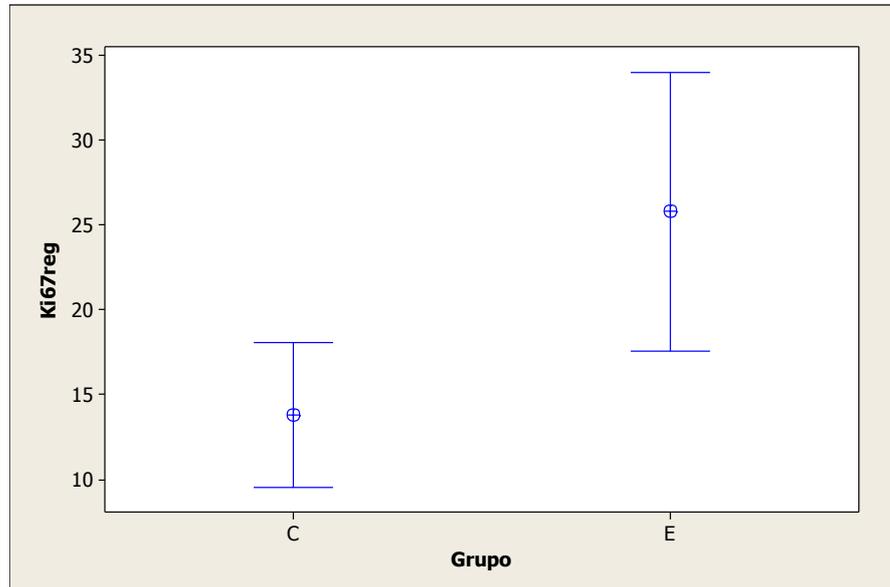


GRÁFICO 4 – Média do número de células expressando Ki67 na área de regeneração em lesão traumática do fígado de animais controle (C) e submetidos ao campo eletromagnético (E)



6 DISCUSSÃO

Estudos sobre os mecanismos da regeneração do fígado em lesões traumáticas apresentam evidência na literatura médica (PETROIANU *et al.*, 2004; OLIVEIRA, 2007). A descoberta de fatores que possam influenciar de maneira positiva esse processo é alvo de pesquisa em todo o mundo. Entre esses fatores, o eletromagnetismo se destaca, devido ao grande potencial para estimular o processo de cicatrização em diversos tecidos e órgãos (OTTANI *et al.*, 1984; BORSATO, 2009). Uma vez que não encontramos na literatura estudos clínicos em seres humanos sobre o uso do campo eletromagnético na regeneração de lesões traumáticas do fígado, e pelo desconhecimento dos possíveis efeitos deletérios sobre o organismo, optou-se pela realização de ensaio experimental.

A maioria dos estudos sobre regeneração hepática em seres vivos utiliza como modelo a ressecção de parte do fígado de ratos proposta por Higgins e Anderson em 1931 (TODERKE, 2009). Nesse modelo realiza-se a retirada de 70% da massa hepática mediante ressecção dos lobos mediano e lateral esquerdos. Apesar de ser relativamente fácil de ser reproduzido, esse modelo não representa de forma fidedigna os mecanismos fisiopatológicos relacionados ao trauma hepático. Dentro desse contexto e de acordo com o objetivo do estudo justificou-se a criação de um novo modelo para a análise dos efeitos da cicatrização em fígado traumatizado de ratos sob o efeito de um campo eletromagnético dinâmico.

A utilização de ratos adultos possibilitou o estudo do fenômeno da regeneração hepática na ausência de mecanismos que poderiam atuar na divisão celular durante o estímulo de crescimento. A raça *Wistar* foi selecionada devido a seu fácil manuseio e por ser a mais utilizada em estudos que envolvem o assunto na literatura. O número de animais por grupo necessários para se obter significância estatística está de acordo com as pesquisas de Eckelman *et al.* (2007) e Damy *et al.* (2010). O lobo medial esquerdo do fígado foi o local de realização do trauma devido à facilidade de acesso e manuseio. A técnica

cirúrgica empregada foi testada previamente em projeto piloto com relação à reprodutibilidade e ocorrência de complicações que inviabilizassem a realização deste estudo. A aplicação do campo eletromagnético foi feita imediatamente após a realização do trauma hepático, pois em ratos os processos de regeneração iniciam-se logo após o trauma, e a maioria das modificações fundamentais são estabelecidas no prazo de 24 horas (TODERKE, 2009).

Na aplicação do campo eletromagnético, as frequências entre 10 Hz e 300 Hz são mais indicadas para estudos experimentais em modelo animal (BORSATO, 2009). A frequência da corrente elétrica geradora do campo utilizada no presente estudo foi de 60 Hz. A intensidade do campo eletromagnético na cicatrização de órgãos e tecidos varia entre os estudos experimentais. Ottani *et al.* (1984) utilizaram campo eletromagnético de intensidade de 6 mT seguido de pulsos de 0,6 mT em ratos submetidos à hepatectomia parcial. Borsato (2009) utilizou intensidade de 10,04 mT em anastomoses colônicas em ratos. Cridland *et al.* (1999) estabeleceu, como parâmetros para estudos experimentais, intensidades de campo eletromagnético entre 0,2 mT e 20 mT. Devido a ausência de padronização quanto a intensidade ideal para obter os melhores efeitos na regeneração hepática em modelos animais e à grande variação na literatura a respeito do assunto, optou-se por empregar no presente estudo, campo eletromagnético de 4,62 mT de intensidade, conforme proposto por Borsato (2009).

A restauração da massa hepática em ratos inicia-se imediatamente após o trauma e finaliza-se em sete a dez dias (RAMALHO *et al.*, 2003). Estudo em ratos submetidos à hepatectomia parcial mostrou influência do campo eletromagnético, uma vez que houve aumento do peso e das proteínas totais do fígado nos três primeiros dias de regeneração, quando comparado com o grupo controle (OTTANI, 1984). No presente estudo, optou-se por analisar os efeitos do campo eletromagnético 72 horas após o procedimento cirúrgico com o intuito de reduzir o efeito da regeneração natural do organismo.

A regeneração hepática foi avaliada por análises histológica, por coloração HE, e imunoistoquímica, com os marcadores ssDNA e Ki67. Apesar de ser

considerado um método de avaliação subjetivo e observador dependente a análise histológica da contagem de células, avaliando-se figuras de mitose por meio da coloração HE, continua sendo um dos parâmetros para corroborar o estudo da regeneração hepática (ASSY e MINUK, 1997; TODERKE, 2009). Os resultados da análise histológica permitiram verificar que não houve diferença significativa entre os grupos de animais quando se comparou presença de inflamação acentuada, fibroplasia moderada a acentuada, angiogênese moderada a acentuada e presença de regeneração e necrose extensas.

O Ki67 é um antígeno celular associado a todas as fases do ciclo celular e tem sido utilizado para quantificar a atividade proliferativa do parênquima hepático, verificando o porcentual de células fora do período G_0 . O grupo de animais submetidos ao campo eletromagnético apresentou maior porcentual de hepatócitos marcados na área de regeneração quando comparado com o grupo controle, revelando maior número de hepatócitos fora do período G_0 sob a influência do campo eletromagnético. Entretanto, ao se comparar os hepatócitos marcados na área de necrose não houve diferença entre os grupos.

O ssDNA, antígeno marcador de apoptose celular, foi avaliado tanto na área de necrose quanto na de regeneração de ambos os grupos de animais e não houve diferença significativa, quanto a presença desse marcador. Esse dado sugere que o uso do eletromagnetismo no trauma hepático não gera aumento do número de células mortas pelo mecanismo de apoptose, entretanto, faz-se necessário novos estudos sobre esse tema.

Esses dados sugerem que, por mecanismos ainda desconhecidos, parece haver maior estímulo regenerativo em fígado de ratos submetidos à ação do campo eletromagnético na fase proliferativa da regeneração hepática, no entanto não parece haver aumento da área de morte celular nesses animais, quando comparados ao grupo controle, o que sugere influência positiva para a regeneração de lesões hepáticas secundárias ao trauma. Esses resultados estão em concordância com os resultados apresentados por Ottani, 1984.

O uso do campo eletromagnético dinâmico no trauma hepático revelou-se promissor e pode vir a se constituir em alternativa eficaz no tratamento dessa enfermidade. O estabelecimento de protocolos e o incentivo à descoberta de alternativas terapêuticas para o auxílio no tratamento dessa enfermidade é fundamental para a redução de sua morbimortalidade. A escassez de artigos científicos que abordam o uso do campo eletromagnético no trauma hepático e os resultados promissores desta pesquisa constituem-se em estímulo para a realização de novos estudos.

7 CONCLUSÃO

Com base nesta pesquisa pode-se afirmar que o uso do campo eletromagnético dinâmico em ratos submetidos à lesão traumática do fígado promoveu aumento da proliferação celular na área de regeneração, mas não contribuiu para modificar as alterações histológicas, assim como as áreas de necrose e de regeneração do parênquima hepático.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, L. R. F.; NASSIF, P. A. N.; RIBAS, C. A. P. M.; CZECZKO, N. G.; RIBAS, M. M.; MARINHO JÚNIOR, C. H.; WENDLER, E. Liver regeneration after partial hepatectomy in rats submitted to post-hepatic portal hypertension. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, v. 24, n. 2, p. 144-51, abr./jun. 2011. ISSN 0102-6720.

ASSIOTIS, A.; SACHINIS, N. P.; CHALIDIS, B. E. Pulsed electromagnetic fields for the treatment of tibial delay unions and nonunions. A prospective clinical study and review of the literature. **J Orthop Surg**, v. 24, n. 7, p. 1-6. 2012. ISSN 1749-799X.

ASSY, N.; MINUK, G. Y. Liver regeneration: methods for monitoring and their applications. **J Hepatol**, v. 26, n. 4, p. 945-52, abr. 1997. ISSN 0168-8278.

BAHTEN, L. C.; NICOLUZZI, J. E.; OLANDOSKI, M.; PANTANALI, C. A. R.; SILVA, R. F. K. C. Blunt abdominal trauma: analysis of the patients victims of splenic trauma in a University Hospital of Curitiba. **Rev Col Bras Cir**, v. 33, n. 6, p. 369-74, nov./dez. 2006. ISSN 0100-6991.

BORSATO, L. H. S. Estudo dos efeitos do campo eletromagnético na cicatrização de anastomoses intestinais – modelo experimental em ratos. Dissertação – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Departamento de informática do Sistema Único de Saúde. Informação de saúde. Sistemas e aplicativos (monografia na Internet)*. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. [cited 2012 jan 6]; Available from: <http://www.datasus.gov.br>.

BULLOCK, A. J.; BARKER, A. T.; COULTON, L.; MACNEIL, S. The effect of induced biphasic pulsed currents on re-epithelization of novel wound healing model. **Bioelectrom**, v. 28, n. 1, p. 31-41, jan. 2007. ISSN 0197-8462.

CRIDLAND, N. A.; SABOUR, N. R.; SAUNDERS, R. D. Effects of 50Hz magnetic field exposure on the rate of RNA synthesis by normal human fibroblasts. **In J Radiat Biol**, v. 75, n. 5, p. 647-54, mai. 1999. ISSN 0955-3002.

DAMY, S. B.; CAMARGOS, R. S.; CHAMMAS, R. FIGUEIREDO, L. F. P. Aspectos fundamentais da experimentação animal – Aplicações em cirurgia experimental. **Rev Ass Med Bras**, v. 56, n. 1, p. 103-111, 2010. ISSN 0100-6991.

DRUMOND, D. A. F.; VIEIRA JR, H. M. Tratamento não-operatório da lesão hepática. Protocolos em trauma – Hospital de Pronto Socorro João XXIII. 1ª ed. Belo Horizonte: Medbook, 2009. cap. 18.

ECKELMAN, W. C.; KILBOURN, M. R.; JOYAL, J. L.; LABIRIS, R.; VALLIANT, J. F. Justifying the number of animals for each experiment. **Nucl Med Biol**, v. 34, p. 229-32, 2007. ISSN 0969-8051.

FAUSTO, N.; CAMPBELL, J. S.; RIEHLE, K. J. Liver regeneration. **Hepatology**, v. 43, n. 2, s. 1, p. 45-53, fev. 2006. ISSN 0270-9139.

FUNK, R. H. W.; MONSEES, T.; Özkucur, N. Electromagnetic effects – From cell biology to medicine. **Prog Histochem Cytochem**, v. 43, n. 4, p. 117-264, fev. 2009. ISSN 0079-6336.

GRANA, D. R.; MARCOS, H. J. A.; KOKUBU, G. A. Pulsed electromagnetic fields as adjuvant therapy in bone healing and peri-implant bone formation: an experimental study in rats. **Acta Odontol Latinoam**, v. 21, n. 1, p. 77-83, 2008. ISSN 0326-4815.

JESUS, R. P.; WAITZBERG, D. L.; CAMPOS, F. G. Regeneração hepática: papel dos fatores de crescimento e nutrientes. **Rev Assoc Med Bras**, v. 46, n. 3, p. 242-54, jul./set. 2000. ISSN 0104-4230.

JUSZCZAK, K.; KASZUBA-ZWOINSKA, J.; THOR, P.J. Pulsating electromagnetic field stimulation of urothelial cells induces apoptosis and diminishes necrosis: new insight to magnetic therapy in urology. **J Physiol Ph**, v. 63, n. 4, p.397-401. 2012. ISSN 0867-5910.

KUNG, J. W. C.; FORBES, S. J. Stem cells and liver repair. **Curr Opin Biotechnol**, v. 20, n. 5, p. 568-74, out. 2009. ISSN 0958-1669.

MASCARENHAS, M. D. M.; MONTEIRO, R. A.; SÁ, N. N. B.; GONZAGA, L. A. A.; NEVES, A. C. M.; ROZA, D. L.; SILVA, M. M. M. A.; DUARTE, E. C.; MALTA, D. C. Epidemiologia das causas externas no Brasil: mortalidade por acidentes e violências no período de 2000 a 2009. *Saúde Brasil 2010: Uma análise da situação de saúde e de evidências selecionadas de impacto de ações de vigilância em saúde*. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. p. 225-249.

MÁXIMO, A.; ALVARENGA, B. Física: Contexto e Aplicações, Volume 3. 1ª ed. São Paulo: Scipione, 2011. cap 24.

MORINAGA, S.; ISHIWA, N.; NOGUCHI, Y.; YAMAMOTO, Y.; RINO, Y.; IMADA, T.; TAKANASHI, Y.; AKAIKE, M.; SUGIMASA, Y.; TAKEMIYA, S. Growth index, assessed with Ki-67 and ssDNA labeling; a significant prognosticator for patients undergoing curative resection for hepatocellular carcinoma. **J Surg Oncol**, v. 92, n. 4, p. 331-6, dez. 2005. ISSN 0022-4790.

NURSAL, T. Z.; BAL, N.; ANARAY, R.; COLAKOGLU, T.; NOYAN, T.; MORAY, G.; HABERAL, M. Effects os static magnetic field on wound healing: results in experimental rat colon anastomoses. **Am J Surg**, v. 192, n. 1, p. 76-81, jul. 2006. ISSN 0002-9610.

OLIVEIRA, E. M. S. Efeito modulador do café sobre a carcinogênese hepática induzida em ratos. Dissertação – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

OTTANI, V.; MONTI, M. G.; PICCININI, G.; PERNECCO, L.; ZANIOL, P.; RUGGERI, A.; BARBIROLI, B. Pulsed eletromagnetic fields increase the rate of rat liver regeneration after partial hepatectomy. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 176, n. 4, p. 371-7, set. 1984. ISSN 0037-9727.

PATRUNO, A.; AMERIO, P.; PESCE, M.; VIANALE, G.; DI LUZIO, S.; TULLI, A.; FRANCESCHELLI, S.; GRILLI, A.; MURARO, R.; REALE, M. Extremely low frequency eletromagnetic fields modulate expression of inducible nitric oxide synthase, endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in the human

keratinocyte cell line HaCat: potencial therapeutic effects in wound healing. **Br J Dermatol**, v. 162, n. 2, p. 258-66, fev. 2010. ISSN 0007-0963.

PÄUN, S.; BEURAN, M.; NEGOI, I.; RUNCANU, A.; GASPARGAS, B. Trauma epidemiology: Where are we today? **Chirurgia**, v. 106, n. 4, p. 439-43, ago. 2011. ISSN 1221-9118.

PETROIANU, A.; ESQUERDO, C. R. M.; BARBOSA, A. J. A.; ALBERTI, L. R. Hepatic regeneration induced by segmental liver resection, in rats. **Rev Col Bras Cir**, v. 31, n. 1, p. 10-14, jan./fev. 2004. ISSN 0100-6991.

RAMALHO, F. S.; RAMALHO, L. N. Z.; ZUCOLOTO, S. SILVA JR, O. C. Regeneração hepática: algumas definições num universo de incertezas. **Acta Cir Bras**, v. 8, n. 4, p. 177-89, 1993. ISSN 1678-2674.

RAMALHO, F. S. A regeneração hepática e os inibidores da enzima conversora da angiotensina. **Acta Cir Bras**, v. 15, s. 2, p. 1-6, 2000. ISSN 1678-2674.

RENZ, B. M.; FELICIANO, D. V. Gunshot wounds to the right thoracoabdomen: a prospective study of nonoperative management. **J Trauma**, v. 37, n. 5, p. 737-44, nov. 1994. ISSN 0022-5282.

STALHSCHMIDT, C. M. M.; FORMIGHIERI, B.; MARCON, D. M.; TAKEJIMA, A. L.; SOARES, L. G. S. Trauma hepático: epidemiologia de cinco anos em um serviço de emergência. **Rev Col Bras Cir**, v.35, n.4, p. 225-8, 2008. ISSN 0100-6991.

STRACIERI, L. D. S.; SCARPELINI, S. Hepatic injury. **Acta Cir Bras**, v. 21, s. 1, p. 85-8, 2006. ISSN 1678-2674.

TANNURI, A. C. A. Modelos de regeneração hepática em animais em crescimento: estudos histológicos, moleculares e avaliação de efeitos imunossupressores. Dissertação – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

VELMAHOS, G. C.; TOUTOUZAS, K.; RADIN, R.; CHAN, L.; RHEE, P.; TILLOU, A.; DEMETRIADES, D. High success with nonoperative management of blunt hepatic trauma. **Arch Surg**, v. 138, n. 5, p. 475-81, mai. 2003. ISSN 0004-0010.

ANEXOS

ANEXO A – CERTIFICADO CETEA



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 269/2010**, relativo ao projeto intitulado "**Efeito do campo eletromagnético na regeneração hepática em ratos**", 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 **14/ 12/2010**.

Este certificado expira-se em **14/ 12/ 2015**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 269/2010**, related to the project entitled "**Effect of dynamic electromagnetic field on liver regeneration in rats**", 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 **December 14, 2010**.

This certificate expires in **December 14, 2015**.

Belo Horizonte, 17 de Dezembro de 2010.

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@prpq.ufmg.br

ANEXO B – PRINCÍPIOS ÉTICOS DA EXPERIMENTAÇÃO

CETEA - UFPA

PRINCÍPIOS ÉTICOS PARA O USO DE ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA), que agora será também denominado CEUA (Comissão de Ética no USO de Animais), estabelece normas gerais para a utilização de animais para pesquisa e para procedimentos pedagógicos (aulas práticas, treinamentos etc.). 1- PARA PROCEDIMENTOS PEDAGÓGICOS as aulas práticas que utilizam animais para a demonstração ou treinamento de alunos regularmente matriculados em cada disciplina dos diferentes cursos de graduação e programas de pós-graduação deverão ser igualmente protocoladas. O encaminhamento do processo ao CETEA é feito pelo chefe do departamento acadêmico. A cada dois anos, o protocolo deverá ser submetido a nova avaliação ou sempre que, nesse período, ocorrerem alterações significativas no conteúdo prático.

Em documento anexo, os projetos de ensino deverão incluir as informações que fazem parte do programa da disciplina e que foram contempladas no formulário, sempre que aplicáveis, tais como:

- Programa da disciplina, incluindo o cronograma das práticas semestrais
- Objetivos de cada aula prática
- Justificativa para o uso de animais, quando não forem utilizados métodos substitutivos
- Número de alunos/aula, grupo de alunos x animal e tipo de participação (visualização, participação ativa, execução, etc)
- Origem, cuidados sanitários, manejo e alimentação etc.
- Descrição breve dos procedimentos, principalmente os invasivos, pré e pós-operatórios
- Protocolos pré-anestésicos e de anestesia utilizados durante a aula prática
- Destino dos animais não eutanasiados
- Método de eutanásia e destino dos animais
- Métodos substitutivos já em uso nas aulas práticas e que dispensam o uso de animais a exemplo de filmes e simulações em objetos modelados ou em computadores
- Outros dados que, a juízo do docente, são importantes para a avaliação do projeto de ensino ou de treinamento.

Os cursos de treinamento destinados a docentes, discentes e aqueles abertos aos inscritos em congressos, seminários e eventos científicos afins deverão ser igualmente protocolados, sempre que seja previsto o uso de animais. 2- PARA PROCEDIMENTOS DE PESQUISA 1.O uso de animais de experimentação deve estar de acordo com a legislação vigente (ver em "Informações úteis").

2. A pesquisa envolvendo animais de experimentação deve ser aplicável à saúde humana ou animal, ao benefício geral da sociedade e ao avanço do conhecimento científico

3. As condições de vida dos animais devem ser seguras e confortáveis.

4. Acesso a cuidados veterinários deve estar disponível em todos os momentos de maneira que possam ser empregados sempre que for necessário.

5. Na medida do possível, procedimentos alternativos que substituam de forma parcial ou completa o uso de animais, tais como modelos matemáticos, simulações em computador e sistemas biológicos in vitro, devem ser utilizados.

6. Os animais devem ser cuidadosamente selecionados, de forma a utilizar a espécie e linhagem mais adequadas ao propósito do estudo.

7. Delineamentos experimentais apropriados devem ser elaborados com o objetivo de reduzir o número de animais utilizados nos protocolos.

8. Todas as etapas do estudo com animais de experimentação devem ser realizadas de maneira a minimizar o desconforto ou dor. Os pesquisadores devem assumir que procedimentos causadores de dor e desconforto em humanos podem induzir respostas semelhantes nos animais de experimentação.

9. Os procedimentos cirúrgicos devem ser realizados levando-se em conta as técnicas de anti-sepsia e assepsia e o uso correto de sedativos, anestésicos e analgésicos.

10. O uso de agentes paralisantes musculares deve ser evitado. Se necessário, devem ser usados somente em animais devidamente anestesiados.

11. Animais submetidos a dor ou desconforto crônicos, que não podem ser aliviados, devem ser sacrificados, utilizando-se procedimentos indolores ou que causem o menor sofrimento possível.

12. Procedimentos dolorosos ou eutanásia não devem ser realizados na presença de outros animais.

13. Os pesquisadores e todo o pessoal que maneja e utiliza animais devem ser qualificados e treinados regularmente para conduzir os procedimentos.

14. Protocolos envolvendo o uso de animais de experimentação devem ser avaliados pelo CETEA.

15. As exceções a qualquer um dos princípios deste Guia serão avaliadas pelo CETEA.

ANEXO C – FOLHA DE APROVAÇÃO

	<p style="text-align: center;">UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA</p>	
---	--	---

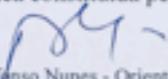
FOLHA DE APROVAÇÃO

**EFEITO DO CAMPO ELETROMAGNÉTICO APÓS
LESÃO TRAUMÁTICA EM FÍGADO DE RATOS**

MARCELLE SOUZA ALVES DA SILVA

Dissertação 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 Mestre em CIÊNCIAS APLICADAS À CIRURGIA E À OFTALMOLOGIA, área de concentração CICATRIZAÇÃO, linha de pesquisa Fatores

Aprovada em 05 de agosto de 2013, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Tarcizo Afonso Nunes - Orientador
UFMG

Prof(a). Ivana Duval de Araujo
UFMG


Prof(a). Cristiano Xavier Lima
UFMG


Prof(a). Ruy Garcia Marques
UERJ

Belo Horizonte, 5 de agosto de 2013.