

**EFEITOS DA OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA APÓS ISQUEMIA  
HEPÁTICA SEGMENTAR NORMOTÉRMICA E REPERFUSÃO, EM  
COELHOS: AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA, MORFOLÓGICA E DA  
MICROCIRCULAÇÃO HEPÁTICA PELA ULTRA-SONOGRAFIA  
CONTRASTADA.**

**Maria Cecília Souto Lúcio de Oliveira**

Belo Horizonte

2008

**Maria Cecília Souto Lúcio de Oliveira**

**EFEITOS DA OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA APÓS ISQUEMIA  
HEPÁTICA SEGMENTAR NORMOTÉRMICA E REPERFUSÃO, EM  
COELHOS: AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA, MORFOLÓGICA E DA  
MICROCIRCULAÇÃO HEPÁTICA PELA ULTRA-SONOGRAFIA  
CONTRASTADA.**

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 parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina.

**Área de Concentração:** Resposta inflamatória à agressão tecidual.

**Linha de pesquisa:** Resposta inflamatória no choque circulatório.

**Orientador:** Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches.

Belo Horizonte

2008

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS – UFMG**

**Reitor:**

Prof. Dr. Ronaldo Tadeu Penna

**Vice-Reitora:**

Profa. Dra. Heloísa Murgel Starling

**Pró-Reitor de Pós-Graduação:**

Prof. Dr. Jaime Arturo Ramirez

**Diretor da Faculdade de Medicina:**

Prof. Dr. Francisco José Penna

**Vice diretor da Faculdade de Medicina:**

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

**Coordenador do Centro de Pós-Graduação:**

Prof. Dr. Carlos Faria Amaral

**Chefe do Departamento de Cirurgia:**

Prof. Dr. Walter Antônio Pereira

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

**Coordenador:** Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo

**Sub-coordenador:** Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Prof. Dr. Márcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Marco Aurélio Lana Peixoto

**EFEITOS DA OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA APÓS ISQUEMIA  
HEPÁTICA SEGMENTAR NORMOTÉRMICA E REPERFUSÃO, EM  
COELHOS: AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA, MORFOLÓGICA E DA  
MICROCIRCULAÇÃO HEPÁTICA PELA ULTRA-SONOGRAFIA  
CONTRASTADA.**

Tese apresentada e defendida perante a Comissão Examinadora, constituída pelos Professores:

---

Profa. Dra. Maria Cristina Chammas

---

Prof. Dr. Omar Feres

---

Profa. Dra. Vivian Resende

---

Prof. Dr. Edson Samesima Tatsuo

---

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches (orientador)

Belo Horizonte, 14 de abril de 2008

Faculdade de Medicina

Universidade Federal de Minas Gerais

## DEDICATÓRIA

A meu filho, José Bernardo, meu melhor presente, que, com sua presença, amor e sinceridade, continua a preencher minha vida de luz e sentido.

A meus pais, Bernardo e Joelisa, pelo seu amor, exemplo de vida, apoio e insistência para que eu concluísse este trabalho e perseverasse na vida acadêmica.

A Edivandro Souza Marques, companheiro de todas as horas, inclusive as madrugadas frias no biotério, pelo amor sólido que me proporciona serenidade, lucidez e força para escolher meu caminho.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches, orientador, pelo exemplo de persistência, serenidade e dedicação, pela confiança e disponibilidade na orientação neste trabalho.

Ao Dr. Rogério Augusto Pinto-Silva por seu entusiasmo, paciência na fase de desenvolvimento do método científico, ensinamentos e dedicação na realização dos exames ultra-sonográficos contrastados.

Ao Dr. Omar Lopes Cançado Júnior pelas sugestões e auxílio, fundamentais para concretização deste trabalho, pela inestimável ajuda na minha profissão, pelos ensinamentos e pela verdadeira amizade.

Ao Dr. Geraldo Magela de Azevedo Júnior que, com toda competência, dedicação e presteza realizou a avaliação histológica deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Roberto Carlos de Oliveira e Silva, por sua presteza e atenção ao disponibilizar o Centro de Medicina Hiperbárica.

Ao Prof. Dr. José Renan da Cunha Melo pela disponibilização do seu laboratório.

Ao Dr. Cristiano Xavier Lima, que iniciou a linha de pesquisa de isquemia e reperfusão e oxigenoterapia hiperbárica, pelas orientações e sugestões.

Ao médico veterinário Hidelbrando Fulgêncio Filho, pelo fundamental auxílio para realização da anestesia dos coelhos.

Ao acadêmico Thiago Silva Ramos por sua ajuda, disponibilidade e interesse na execução deste trabalho.

A Pedro Ribeiro dos Santos, funcionário do Centro de Medicina Hiperbárica, pela atenção e dedicação na realização das sessões de oxigenoterapia.

A Marcelo Moreira de Jesus, Derlim Severiano de Paula e José Maia Oliveira, funcionários do Biotério da Faculdade de Medicina, pelos cuidados com os coelhos e pela disponibilidade para concretização do trabalho.

"A ciência sem fé é incompleta, a fé sem  
ciência é obscura." Albert Einstein

## RESUMO

As alterações que se manifestam durante a reperfusão sanguínea de um órgão submetido a período de isquemia são denominadas lesões de isquemia e reperfusão. Elas são caracterizadas por desarranjo circulatório e metabólico, disfunção celular e lesão tecidual. Vários métodos cirúrgicos e farmacológicos são descritos para atenuar sua intensidade e/ou reduzir suas conseqüências deletérias. O uso terapêutico da oxigenoterapia hiperbárica (OH) tem-se ampliado nas últimas décadas, mas, sua aplicação na prevenção e/ou tratamento das lesões de isquemia e reperfusão hepáticas ainda não está definida.

Com o objetivo de avaliar os efeitos da OH na reperfusão hepática, após isquemia segmentar normotérmica, foram analisados os seguintes parâmetros: avaliação da integridade celular medida pela concentração sérica de aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT) e desidrogenase láctica (LDH), avaliação da microcirculação hepática medida pela ultra-sonografia com contraste de microbolhas, 24 horas após a reperfusão e avaliação das alterações morfológicas do fígado. Para isto, foram utilizados 22 coelhos machos, da raça Nova Zelândia, separados, aleatoriamente, em dois grupos: grupo controle (n=10)- realizada laparotomia, isquemia hepática segmentar normotérmica por 60 minutos, reperfusão, ultra-sonografia com contraste de microbolhas 24 horas após a reperfusão; grupo OH (n=12)- realizada laparotomia, isquemia hepática segmentar normotérmica por 60 minutos, reperfusão, oxigenoterapia hiperbárica por 60 minutos, ultra-sonografia com contraste de microbolhas 24 horas após a reperfusão. As concentrações séricas de AST, ALT e LDH foram dosadas antes da isquemia, dez minutos e 24 horas após a reperfusão hepática. A análise morfológica consistiu em avaliação macroscópica e microscópica por coloração com hematoxilina-eosina.

O tratamento com OH não modificou os níveis séricos de AST, ALT e LDH, reduziu a lesão da microcirculação hepática, quando avaliada pela ultra-sonografia com contraste de microbolhas, reduziu a lesão hepática à macroscopia e não modificou o padrão de lesão histológica à microscopia.

## **ABSTRACT**

Interruption of blood flow to an organ or tissue (ischemia) and subsequent reperfusion lead to an acute inflammatory response that may cause significant cellular damage and organ dysfunction. It is called ischemia/reperfusion injury.

Hepatic ischemia/reperfusion injury is characterized by circulatory and metabolic derangements, liver dysfunction and tissue damage. There were a large number of strategies to protect the liver from injuries caused by ischemia and reperfusion, like surgical and pharmacologic strategies and gene therapy. Hyperbaric oxygen therapy (HBO) is an effective adjunct in treating ischemia-reperfusion injury of brain, small intestine, testis and crushing extremities. Some studies were designed to test the effect of hyperbaric oxygen therapy to protect the liver against ischemia/reperfusion injury.

The objective of this study was to assess changes of hepatic microvascular perfusion (microbubble-enhanced ultrasonography) as related to hepatic morphology and hepatocellular integrity (serum aspartate aminotransferase- AST, alanine aminotransferase- ALH and lactic dehydrogenases- LDH). Twenty-two male New Zealand rabbits were subjected to 60 minutes of normothermic, segmental, hepatic ischemia, followed by 60 minutes of reperfusion. The HBO group (n=12), was exposed to one session of 60 minutes of hyperbaric oxygen after reperfusion. Ten rabbits maintained under normobaric room air served as controls. Microbubble-enhanced ultrasonography was performed 24 hours after reperfusion in the 22 rabbits. Serum AST, ALT and LDH were determined in samples collected before ischemia, 10 minutes and 24 hours after hepatic reperfusion. Hepatic morphology was evaluated by macroscopic and light microscopy study of paraffin-embedded sections stained by hematoxylin and eosin.

Hyperbaric oxygen therapy after ischemia and reperfusion didn't modify serum AST, ALT and LDH activities, attenuated the hepatic microvascular perfusion impairments at microbubble-enhanced ultrasonography and didn't modify the histological finds.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1- Distribuição do peso (g) para os grupos de estudo.....	44
Gráfico 2- Distribuição da soma das áreas com alteração de perfusão(cm), evidenciadas à ultra-sonografia com contraste para os grupos de estudo.....	45
Gráfico 3- Distribuição da área de necrose macroscópica (cm) para os grupos de estudo.....	46
Gráfico 4- Gráfico de dispersão para área hipoecoica definida à ultra-sonografia basal e soma da área de necrose macroscópica.....	52
Gráfico 5- Frequência de necrose macroscópica por ecogenicidade do parênquima hepático à ultra-sonografia basal.....	53
Figura 1- Pedículo dos lobos médio e maior clampado com clamp vascular tipo "Bulldog". O parênquima clampado está isquêmico, restante do fígado de aspecto normal.....	34
Figura 2- Câmara hiperbárica multiplace Seaway Diver. Volume total 16,60 m <sup>3</sup> . Peso vazio 9.500 Kg. Ano de fabricação 2000.....	35
Figura 3- Parte interna da câmara hiperbárica multiplace.....	36
Figura 4- Ultra-sonografia com contraste de microbolhas. Fígado com perfusão microvascular homogênea.....	37
Figura 5- Ultra-sonografia com contraste de microbolhas. Área com alteração de perfusão, com padrão em mosaico, medida em seus dois maiores diâmetros.....	38
Figura 6- Ultra-sonografia com contraste de microbolhas. Área sem perfusão central, medida em dois diâmetros, ao lado da vesícula biliar.....	39

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Análise descritiva do peso nos grupos controle e OH.....	42
Tabela 2-	Análise descritiva dos exames bioquímicos nos grupos controle e OH.....	43
Tabela 3-	Análise descritiva das áreas hipoecóicas definidas à ultra-sonografia basal, áreas com alteração de perfusão à ultra-sonografia com contraste e necrose macroscópica presentes nos grupos controle e OH.....	43
Tabela 4-	Avaliação ultra-sonográfica basal da ecogenicidade do parênquima hepático, por grupo de estudo (n=22).....	47
Tabela 5-	Avaliação ultra-sonográfica com contraste das bordas das áreas de lesão, por grupo de estudo (n=22).....	48
Tabela 6-	Freqüência do padrão de perfusão do contraste na área de lesão identificada à ultra-sonografia, por grupo de estudo (n=22).....	48
Tabela 7-	Freqüência de necrose macroscópica, por grupo de estudo (n=22).....	49
Tabela 8 -	Freqüência de necrose maciça à microscopia, por grupo de estudo (n=22).....	49
Tabela 9-	Freqüência de necrose focal, à microscopia, por grupo de estudo (n=22).....	50
Tabela 10-	Freqüência de degeneração hidrópica, à microscopia, por grupo de estudo (n=22).....	50
Tabela 11-	Teste de Spearman para áreas hipoecóicas definidas à ultra-sonografia basal, áreas com alteração de perfusão à ultra-sonografia contrastada e tamanho das áreas de necrose à macroscopia.....	51
Tabela 12-	Comparação entre presença de necrose macroscópica e ecogenicidade do parênquima hepático à ultra-sonografia basal (n=22).....	53
Tabela 13-	Comparação entre o padrão de perfusão do contraste no fígado e a presença de necrose maciça à microscopia (n=22).....	54

Tabela 14-	Comparação entre o padrão de perfusão do contraste nas áreas de lesão e a presença de necrose focal (n=22).....	55
Tabela 15-	Comparação entre o padrão de perfusão do contraste nas áreas de lesão e a presença de degeneração hidrópica (n=22).....	56

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
ALT	Alanina-aminotransferase
AMP	Monofosfato de adenosina
AST	Aspartato-aminotransferase
ATM	Atmosferas
ATP	Trifosfato de adenosina
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
LDH	Desidrogenase láctica
OH	Oxigenoterapia hiperbárica
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
VCAM	Molécula de adesão das células vasculares

## ÍNDICE

1. Introdução.....	16
2. Revisão da Literatura.....	18
2.1 Lesão de isquemia e reperfusão hepática.....	18
2.2 Contraste ultra-sonográfico.....	24
2.3 Oxigenoterapia hiperbárica.....	26
3. Objetivos.....	31
4. Método.....	32
4.1 Animais.....	32
4.2 Divisão dos grupos.....	32
4.3 Procedimento cirúrgico.....	33
4.3.1 Técnica anestésica.....	33
4.3.2 Técnica operatória.....	33
4.4 Oxigenoterapia hiperbárica.....	34
Avaliação ultra-sonográfica.....	35
Colheita de sangue.....	38
Avaliação bioquímica do sangue.....	39
4.5 Avaliação morfológica.....	39
4.6 Análise estatística.....	40
5. Resultados.....	42
5.1 Comparação do peso e dos exames bioquímicos, nos diferentes tempos de medida, entre os grupos controle e oxigenoterapia hiperbárica.....	42
5.2 Comparação das variáveis entre os grupos controle e OH.....	47
5.3 Comparação entre as variáveis quantitativas.....	51
5.4 Comparação entre as variáveis qualitativas.....	52
6. Discussão.....	57
7. Conclusões.....	72
8. Referências Bibliográficas.....	73
9. Anexos.....	86

## 1- Introdução

As alterações que se manifestam durante a reperfusão sanguínea de um órgão submetido a período de isquemia são denominadas lesões de isquemia e reperfusão. Elas são caracterizadas por desarranjo circulatório e metabólico, disfunção celular e lesão tecidual. No fígado, podem ocorrer após hepatectomia, traumatismo ou transplante, causando disfunção hepática pós-operatória que pode variar de leve intensidade até a não função do órgão.

As alterações observadas no período de reperfusão hepática estão relacionadas, principalmente, com o tempo de duração da isquemia e se expressam por distúrbios da microcirculação, hipotensão arterial sistêmica, elevação da concentração das aminotransferases e da desidrogenase láctica séricas, disfunção mitocondrial, aumento da lipoperoxidação, disfunção e morte celular. Estas alterações se originam de complexa interação entre depleção de ATP, adesão e ativação de leucócitos, células de Kupffer e plaquetas nos sinusóides hepáticos, liberação de proteases e fosfolipases, ativação do complemento, formação de espécies reativas de oxigênio, dentre outros fatores. As espécies reativas de oxigênio têm papel importante na gênese destas. Anti-oxidantes como catalase, superóxido dismutase, peroxidase e glutathione inibem sua ação.

Diversas abordagens já foram descritas com o intuito de se evitar, atenuar ou tratar a lesão de isquemia e reperfusão do fígado. Entretanto, até o momento, não se conhece nenhum método totalmente eficaz, nem que seja aplicável em todas as situações clínicas.

As estratégias de proteção do fígado contra lesões de isquemia e reperfusão, podem ser classificadas de acordo com o mecanismo protetor: indução preemptiva de tolerância às lesões de reperfusão (chamadas pré-condicionamento); atuação direta nas vias de lesão, por redução na formação de moléculas nocivas ou por aumento dos mecanismos de proteção (chamado intervenção direta).

A inalação de oxigênio a 100%, em condições de ambiente com pressão superior a uma atmosfera, proporciona concentração tecidual de oxigênio até vinte vezes maior que a encontrada em condições normoatmosféricas, por via

independente da hemoglobina.

Seu uso terapêutico é denominado oxigenoterapia hiperbárica (OH) e já é utilizado há quatro décadas no Brasil. É eficiente e seguro e possui amplo espectro de indicações. A OH parece reduzir a adesão de leucócitos que ocorre na lesão de reperfusão e inibir a liberação de espécies reativas de oxigênio e de proteases que causam vasoconstrição e dano celular.

Existem poucas publicações da aplicação da OH na lesão de isquemia e reperfusão. A maioria delas avalia a lesão celular pelas aminotransferases, mieloperoxidase tecidual ou pulmonar, malondialdeído ou número de leucócitos aderidos ao endotélio, sem avaliar a microcirculação hepática.

Os meios de contraste, apesar de serem largamente utilizados em radiologia, até recentemente, eram pouco utilizados na ultra-sonografia e se limitavam ao diagnóstico de lesões focais. Os contrastes ultra-sonográficos mais recentes utilizam microbolhas e são marcadores exclusivos do compartimento sangüíneo, permitindo a visualização da microcirculação hepática em tempo real.

Neste trabalho, estudamos o efeito da OH após isquemia e reperfusão hepática, na microcirculação hepática avaliada pela ultra-sonografia com contraste de microbolhas, na integridade hepatocelular e na morfologia hepática.

## **2- Revisão da literatura**

### ***2.1 Lesão de isquemia e reperfusão hepática***

A disfunção hepática pós-ressecção, traumatismo ou transplante hepático é multifatorial e está relacionada à condição pré-operatória do fígado, à agressão tecidual durante o procedimento cirúrgico, ao volume hepático residual e às condições fisiológicas impostas ao órgão no pós-operatório (Selzner et al., 2003).

Durante as hepatectomias parciais, a prevenção e tratamento das hemorragias é de grande importância, pois, protege o fígado de períodos de hipoperfusão e diminui o volume de transfusão de hemoderivados. O aprimoramento técnico e a incorporação de novas tecnologias como o eletrocautério, o coagulador de argônio, o aspirador ultra-sônico e o tromboelastógrafo foram elementos determinantes para redução da grande perda sanguínea que sempre foi associada a estas operações (Lima, 2006).

A clampagem total do pedículo hepático, idealizada para o controle de hemorragias em traumas hepáticos (Pringle, 1908), e a exclusão vascular do fígado (Huguet et al., 1978) são técnicas ainda hoje muito utilizadas em ressecções hepáticas como forma de prevenção e tratamento de sangramentos. No entanto, o tempo de privação de fluxo sanguíneo para o fígado tem grande participação na disfunção hepática pós-operatória. Como forma de aumentar o tempo total de clampagem e minimizar os efeitos deletérios desta isquemia temporária, foram desenvolvidas variações técnicas tais como: a clampagem intermitente do pedículo hepático (Isozaki et al., 1992; Makuuchi et al., 1987), o pré-condicionamento isquêmico (Lloris-Carsi et al., 1993), a ligadura seletiva intra-hepática do pedículo (Launois e Jamieson, 1992) e a oclusão intra-parenquimatosa de ramo da veia porta por balão (Castaing et al., 1989; Shimamura et al., 1986).

O conhecimento de que os efeitos deletérios da isquemia tecidual se prolongam e, até mesmo, se acentuam após a reperfusão se deu em estudo experimental em gatos. Parks e Granger, 1986, demonstraram que a lesão na mucosa do intestino delgado (íleo) produzida por um período isquêmico de três horas, seguidos por uma hora de reperfusão, era mais acentuada do que aquela

conseqüente a quatro horas de isquemia sem reperfusão. Este trabalho deu impulso a novos estudos na pesquisa dos fatores determinantes da então denominada lesão de isquemia e reperfusão tecidual. Trata-se de fenômeno bioquímico e imunológico que pode aparecer em vários órgãos tais como coração (Schaper e Schaper, 1983), pulmões (Takayama et al., 1987), rins (Ratyck e Bulkley, 1986) e cérebro (Uematsu et al., 1989).

Vários trabalhos sugerem que a lesão de isquemia e reperfusão hepática ocorre em duas fases distintas. A fase inicial acontece nas primeiras horas após a reperfusão e está associada à produção de espécies reativas de oxigênio pelas células de Kupffer ativadas e pela redução da cadeia respiratória nos hepatócitos e células endoteliais sinusoidais (Cutrin et al., 1998; González-Flecha et al., 1993; Kobayashi e Clemens, 1992). Na fase subsequente, após 6 a 24 horas, ocorre um intenso processo inflamatório, mediado por oxidantes originados de células extra-hepáticas.

As alterações precoces ocorrem na mitocôndria. A falta do oxigênio para o metabolismo aeróbio leva ao mecanismo anaeróbio. Ocorre redução da fosforilação oxidativa com depleção das reservas de ATP celular e utilização de substratos glicolíticos. O hepatócito pode utilizar sua reserva de glicogênio, substrato para a glicólise anaeróbia, fazendo com que o estado nutricional seja fator determinante do grau de lesão celular isquêmica (Rosser e Gores, 1995).

Cada tipo celular (hepatócito, célula endotelial sinusoidal, célula de Kupffer, célula epitelial dos ductos biliares) tem diferente susceptibilidade às lesões de isquemia e reperfusão. Esta vulnerabilidade também é dependente da variação de temperatura (Rosser e Gores, 1995).

A susceptibilidade diferente das células à isquemia não pode ser explicada simplesmente pela depleção de ATP uma vez que, após 30 minutos de isquemia, 90% do ATP já foi depletado de todos os tipos celulares (Noak et al., 1992). Esta diferença pode ser explicada pelos diferentes níveis de atividade das proteases degradativas intracelulares em cada tipo celular. Os hepatócitos, por exemplo, têm níveis mais altos de protease não-lisossomal durante a hipóxia, quando comparado aos outros tipos celulares (Noak et al., 1992). Os hepatócitos também são altamente sensíveis a hipóxia, independente da região acinar (zonas um, dois e três). O predomínio de lesões na zona três (região centrolobular) deve-se, muito mais, à falta de oxigenação local que à sensibilidade do hepatócito (Rosser et al., 1995). A

hipóxia acarreta lesão por dois mecanismos: depleção de ATP e estresse oxidativo. Isto pode ser confirmado em modelos de perfusão com baixo fluxo em que os hepatócitos da zona de transição (zona dois), que se situam entre células de oxigenação normal (zona um) e células em hipóxia (zona três) perdem a viabilidade mais rapidamente do que nos modelos de não perfusão (Marotto et al., 1988).

Vários estudos (Cursio et al., 1999; Gao et al., 1998; Kohali et al., 1999; Sasaki et al., 1996) sugerem que o processo de isquemia e reperfusão do fígado leva a uma aumento da produção e atividade da caspase-3 (cisteinase especificamente envolvida nas fases de iniciação e execução do processo de apoptose) no tecido hepático, causando morte celular por apoptose de até 50% a 70% das células endoteliais e de 40 a 60% dos hepatócitos. No entanto, Gujral et al., 2001, em estudo experimental em ratos submetidos à isquemia segmentar e reperfusão hepática, utilizando várias técnicas para diferenciação da morte celular por necrose ou apoptose, concluíram que, na maioria das vezes, a morte celular se dá por necrose e que, a utilização de um inibidor da caspase-3 (z-Asp-cmk) não diminuiu os achados histopatológicos nos animais tratados, quando comparados ao grupo controle.

A sugestão da participação de anticorpos no processo de lesão de isquemia e reperfusão surgiu de observações em estudos com animais submetidos à isquemia e reperfusão, nos quais a inibição do complemento limitou a lesão. Na isquemia miocárdica experimental, o uso prévio de um inibidor da C1-esterase previne a deposição de C1q e reduz a área de necrose miocárdica (Buerke et al., 1995). Animais geneticamente deficientes em C3 mostraram menor necrose tecidual local após isquemia intestinal e de músculos esqueléticos (Weiser et al., 1996; Williams et al., 1999). O complexo de ataque à membrana parece ser elemento terminal da lesão causada pelo complemento, como confirmado em estudo nos quais animais deficientes em C5 mostraram menor grau de lesão de isquemia e reperfusão (Austen et al., 1999).

A isquemia leva ao aparecimento de espécies reativas de oxigênio originadas das células parenquimatosas ou dos leucócitos. Estas levam à ativação das células endoteliais com exposição de antígenos nas superfícies celulares, os quais se ligam com uma categoria de anticorpos IgM, denominados anticorpos naturais. Estes são anticorpos produzidos por uma subcategoria de células B-1, CD5-positivas, residentes, predominantemente, nas superfícies pleural e peritoneal, que têm

afinidade por antígenos “self”. O imunocomplexo formado causa a ligação de C1, ativação do complemento e formação de C3a e C3b. Este último causa a ativação do final da cascata do complemento, formando o complexo de ataque à membrana, o qual forma poros nas membranas celulares causando lise celular (Chan et al., 2003). A utilização de inibidor do complemento em ratos submetidos à isquemia-reperfusão atenua a lesão hepática, principalmente quando seu uso precede a isquemia (Heijen et al., 2005).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 1 são duas das principais citocinas implicadas na lesão de isquemia e reperfusão do fígado. Ambas induzem a síntese de interleucina 8 e regulam a expressão de moléculas de adesão, permitindo assim a interação entre endotélio e leucócitos, o que, por sua vez, aumenta a produção de citocinas. TNF- $\alpha$  tem importante papel para a quimiotaxia e ativação de neutrófilos e para geração de superóxidos pelas células de Kupffer. A interleucina 1 induz as células de Kupffer a produzirem TNF- $\alpha$ , além de regular a produção de espécies reativas de oxigênio pelos neutrófilos. Sugere-se que os imunossupressores atenuem a lesão de isquemia e reperfusão do fígado por meio da modulação da produção de TNF- $\alpha$ , já que as concentrações séricas desta citocina estão claramente diminuídas em animais pré-tratados com imunossupressores e submetidos à isquemia e reperfusão. O uso de repertaxin, um novo bloqueador não-competitivo alostérico dos receptores de interleucina 8, inibiu em 96% a infiltração de neutrófilos após 24 horas de reperfusão (Cavaliere et al., 2005). A interleucina 10, citocina antiinflamatória, aparentemente exerce seu efeito por meio da inibição do fator nuclear transcripcional (NF)- $\kappa$ B, já que em murinos, recombinantes da interleucina 10 suprimem a expressão de mRNA para TNF-alfa e moléculas de adesão intercelular, com conseqüente diminuição da lesão de isquemia e reperfusão.

Os efeitos do óxido nítrico no fígado são pouco conhecidos. A comprovação experimental de ser o óxido nítrico a substância relaxante derivada do endotélio (Palmer et al., 1987;), estimulou estudos sobre a sua origem e interferência na perfusão e metabolismo hepático.

A síntese do óxido nítrico se dá pela oxidação da L-arginina sob catalização de uma única enzima, a óxido nítrico sintetase (NOS). Esta enzima tem três isoformas conhecidas: ncNOS, a forma neural e constitutiva; iNOS, forma induzida; eNOS, que é a forma constitutiva encontrada nas células endoteliais. Esta divisão se

baseia na localização, na dependência da calmodulina e na sua identidade molecular (Davies et al., 1995). No fígado são encontradas somente iNOS e eNOS, presentes nos hepatócitos (Geller et al., 1993), células endoteliais (Sessa et al., 1993) e células de Kupffer (somente iNOS) (Billiar, 1995).

O óxido nítrico participa dos mecanismos de proteção contra a lesão de isquemia e reperfusão ao contrapor os efeitos vasoconstritores da ativação das células estreladas nos sinusóides hepáticos pelas endotelinas (Rockey e Chung, 1995), atenuando os efeitos deletérios dos ânions superóxido produzidos pelas células endoteliais, inibindo a agregação e adesão plaquetária e inibindo a interação dos leucócitos às células endoteliais (Huang, 2003). No entanto, nos primeiros momentos da reperfusão hepática, a atuação protetora do óxido nítrico é quase nula devido a sua baixa concentração tecidual, que só aumenta após seis horas, pela ação do fator nuclear  $\kappa$ B que aumenta a expressão da iNOS pelos hepatócitos, células endoteliais e células de Kupffer.

A produção de espécies reativas de oxigênio ocorre principalmente durante o período de isquemia. Experimento em ratos com inibição do fator nuclear KB pela sulfassalazina e pirrolidinedithiocarbamato, momentos antes de clampagem hepática por 60 minutos e reperfusão, mostrou atenuação da lesão hepática de reperfusão, expressa por um menor pico de elevação de ALT, menor atividade da mieloperoxidase tecidual hepática e maior clearance de bromosulfaleína (Matsui, 2005).

Existem várias estratégias de prevenção e tratamento da lesão de isquemia e reperfusão do fígado. Estas podem ser divididas em três diferentes categorias: intervenções cirúrgicas, uso de agentes farmacológicos e terapia genética.

Dentre as intervenções cirúrgicas usadas na prática clínica se destacam o pré-condicionamento isquêmico e a clampagem intermitente. Outros protocolos usados em modelos animais tais como hipertermia (Matsumoto et al., 2001; Terajima et al., 2000), se mostraram eficientes, porém, sua aplicação em seres humanos se limitam a poucas publicações de relatos de casos.

O pré-condicionamento isquêmico tem se mostrado um método simples, efetivo e seguro na prevenção da lesão de isquemia e reperfusão do fígado (Clavien et al., 2000; 2003). Consiste em se realizar curtos períodos de isquemia seguidos de alguns minutos de reperfusão, no período imediatamente anterior à clampagem prolongada do pedículo hepático. Baseia-se na descoberta de que os tecidos

adquirem resistência aos efeitos deletérios da isquemia e reperfusão por meio da exposição prévia a breves períodos de oclusão vascular. Ao relato de aplicação desta técnica na isquemia miocárdica, seguiram-se vários trabalhos sobre os efeitos benéficos no fígado (Azoulay et al., 2006; Clavien et al., 2000; Jassen et al., 2006; Lloris-Carsí et al., 1993; Peralta et al., 1997; Yadav et al., 2002), músculos esqueléticos (Pang et al., 1995), cérebro (Glazier et al., 1994), medula espinhal (Sakurai et al., 1998), rins (Turman e Baten, 1997), retina (Roth et al., 1998), pulmões (Du et al., 1996) e no intestino (Hotter et al., 1996).

Os efeitos do pré-condicionamento isquêmico resultam uma série de eventos em cascata. Em resposta à isquemia hepática, são desencadeados mecanismos protetores, sendo a produção de adenosina o principal deles (Peralta et al., 1997, 1999). A adenosina é liberada no espaço extra-celular em grandes quantidades como produto da ação enzimática no ATP, ADP e AMP, segundos após o início da isquemia. A adenosina exerce seus efeitos protetores hepáticos pela interação com os receptores de adenosina  $A_2$ , inibindo o metabolismo oxidativo e adesão endotelial dos polimorfonucleares, aumentando a estabilidade da membrana celular, aumentando a produção de energia, promovendo o transporte de glicose e, finalmente, reduzindo o influxo de cálcio pela ativação de canais de potássio ATP-dependentes (Cronstein et al., 1986; Howell et al., 2000).

O pré-condicionamento isquêmico do fígado também reduz o acúmulo de xantina e a conversão de xantina-desidrogenase a xantina oxidase, prevenindo assim a produção de espécies reativas de oxigênio e consequente lesão hepática (Fernandez et al., 2002).

O uso do clampeamento intermitente do pedículo hepático em cirurgias que necessitam de longos períodos de isquemia também se mostrou um método eficiente de proteção da lesão de isquemia e reperfusão do fígado (Makuuchi et al., 1987). Estudo comparando o uso desta técnica com o pré-condicionamento mostraram semelhança dos resultados (Rudiger et al., 2002).

Porém, um método ideal e aplicável em várias situações clínicas ainda não foi descoberto e abre espaço para ampla linha de pesquisa.

## **2.2 Contraste ultra-sonográfico**

Os meios de contraste são largamente utilizados em radiologia, entretanto, até recentemente, ocupavam pouco espaço na ultra-sonografia (Blomley et al., 2001; Cosgrove, 2006). O desenvolvimento dos contrastes com microbolhas, que são marcadores exclusivos do compartimento sangüíneo, permitiu ultrapassar os limites da ultra-sonografia convencional. Uma das vantagens inerentes à ultra-sonografia contrastada é a possibilidade de obter o realce em tempo real, sem a necessidade de predefinir tempos de aquisição precisos ou de recorrer a métodos de detecção com bolus. Uma segunda vantagem é a possibilidade de repetir as injeções em razão da ótima tolerância do paciente ao contraste, possibilitando a visualização da microvascularização hepática (Tranquart et al., 2005).

Os contrastes ultra-sonográficos consistem em microbolhas de ar ou gás perfluoropropano estabilizadas por uma membrana externa de fosfolípidos, proteína ou polímeros. Os contrastes de membrana lipídica contêm gás de baixa solubilidade, aumentando a estabilidade das microbolhas. As bolhas são suficientemente pequenas e estáveis para atravessar a circulação cardíaca e pulmonar após infusão periférica e desaparecem à medida que o gás difunde pela fina cápsula externa, com meia vida de poucos minutos (Blomley et al., 2001; Cosgrove, 2006; Tranquart et al., 2005).

Os contrastes de baixa solubilidade têm a particularidade de combinar grande estabilidade e importante ressonância, com baixo índice mecânico e baixo nível de ruptura de bolhas, permitindo a continuação do exame por vários minutos e estudo do realce da lesão em tempo real (Tranquart et al., 2005).

As microbolhas têm aproximadamente o mesmo tamanho das hemácias e não podem se mover através do endotélio vascular para o interstício, mesmo após período prolongado, atuando como verdadeiros agentes do “pool” sangüíneo (Brannigan et al., 2004).

A escolha do tamanho das microbolhas utilizadas na prática clínica é determinada pelo diâmetro dos capilares pulmonares (os menores do organismo), uma vez que elas devem ser capazes de atravessar o leito pulmonar para produzir realce sistêmico após injeção endovenosa. Na prática clínica significa que devem ser menores que 7,0  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Cosgrove, 2006).

De modo geral, os agentes de contraste são extremamente seguros, com baixa incidência de efeitos secundários. Eles não são nefrotóxicos ou cardiotoxicos e a incidência de reação de hipersensibilidade ou alergia parece mais baixa que aquela relacionada aos contrastes de tomografia computadorizada e ressonância magnética (Tranquart et al., 2005; BlomLey et al., 2001).

O realce do contraste ultra-sonográfico é descrito durante fases vasculares definidas (arterial, portal e tardia), da mesma forma que na tomografia computadorizada e ressonância magnética. Entretanto, estes exames não se equivalem devido à característica estritamente intravascular dos contrastes ultra-sonográficos, enquanto a maioria dos contrastes disponíveis para tomografia e ressonância magnética têm difusão intersticial rápida (Brannigan et al., 2004; Blomley et al., 2001).

A definição das três fases vasculares é possível devido à dupla irrigação sanguínea do tecido hepático: pela artéria hepática e pela veia porta (Tranquart et al., 2005).

O realce da lesão na fase arterial é obtido comparando a ecogenicidade da lesão com a do parênquima adjacente no pico da fase arterial. Ambos, o grau e o modo de realce são avaliados. Como a inversão de pulso suprime o eco do tecido normal, a imagem pré-perfusão é escura. Toda ecogenicidade desta fase é atribuída à presença das microbolhas (Brannigan et al., 2004).

O realce das lesões na fase portal é garantido por comparação da ecogenicidade da lesão com o parênquima adjacente. O realce é positivo quando a ecogenicidade é maior ou igual à do parênquima e é negativo quando a ecogenicidade é menor que a do fígado. Como a maior parte do suprimento sanguíneo hepático provém da veia porta, o realce do parênquima torna-se progressivamente maior à medida que se progride da fase arterial para portal (Brannigan et al., 2004).

A origem da fase tardia pode ser a estagnação do contraste nos sinusóides e/ou sua captura pelas células de Kupffer e sistema reticulo-endotelial (Kono et al., 2002).

O aspecto prático da ultra-sonografia com contraste difere das outras modalidades de método de imagem porque o contraste interage com o processo de formação da própria imagem. O principal determinante desta interação é a amplitude de pulso transmitida para o tecido, chamada índice mecânico. Com baixo índice

mecânico, as bolhas são estimuladas em movimento harmônico e podem ser vistas em tempo real, mostrando a morfologia vascular e a evolução do volume vascular com o tempo. Com alto índice mecânico, a oscilação das bolhas torna-se tão pronunciada que podem ser rompidas pelo feixe de ultra-som utilizado para visualizá-las. À medida que são rompidas, as bolhas emitem um eco forte, altamente não linear, que é relativamente fácil de detectar. A imagem resultante revela a distribuição das bolhas ao nível de perfusão da circulação, criando uma simples, mas altamente sensível, imagem do volume vascular (Brannigan et al., 2004).

Na inversão de pulso, os dois pulsos de ultra-som são enviados seqüencialmente do transdutor para o tecido, a fase do segundo pulso é invertida em relação ao primeiro. O aparelho de imagem simplesmente soma os ecos que retornam do tecido. Os ecos do tecido sólido cancelam um ao outro, enquanto os das microbolhas se somam formando um eco de dupla frequência. Assim, o eco do tecido é suprimido e o do agente de contraste é aumentado (Brannigan et al., 2004).

Limitações do método: 1- não permite, em pacientes obesos e nos não cooperativos, uma visualização tão ampla do fígado como na tomografia computadorizada e ressonância magnética, mas esta dificuldade pode ser contornada com persistência e experiência; 2- é operador dependente (Brannigan et al., 2004).

### ***2.3 Oxigenoterapia hiperbárica***

O uso terapêutico do oxigênio em altas pressões iniciou em 1662, por Henshaw (apud Bedrikow e Golin, 2001), um britânico que construiu a primeira câmara para esse propósito.

No Brasil as primeiras experiências com a OH se deram no Rio de Janeiro com Álvaro Ozório, em 1940, que utilizou o método para tratar pacientes com infecções de partes moles (Marcondes e Lima, 2003).

A OH consiste na inalação de oxigênio a 100%, sob pressão superior a uma atmosfera. A câmara hiperbárica consiste em um compartimento selado, resistente à pressão, que pode ser pressurizado com ar comprimido ou oxigênio puro, pode ser de grande porte, acomodando vários pacientes simultaneamente (câmara

multiplace), ou de tamanho menor, acomodando apenas o próprio paciente (câmara monoplace).

A Lei de Boyle diz que o volume de um gás, sob temperatura constante, é inversamente proporcional à pressão exercida sobre este. Em ar ambiente, a hemoglobina está saturada em 98% de oxigênio (19,7 vol% de oxigênio, dos quais aproximadamente 5,8 vol% são extraídos dos tecidos), proporcionando sua concentração dissolvida no plasma de 0,32 vol%. O aumento isolado da pressão do ambiente tem impacto desprezível no conteúdo total de oxigênio presente na hemoglobina, já que a saturação desta encontra-se no limite superior. A oferta de oxigênio inspirado a 100% aumenta a concentração de oxigênio dissolvido no plasma sanguíneo para 2,09 vol%. Quando se associa ao aumento da pressão ambiente para 2,5 atmosferas, sua concentração no plasma alcança 6,8 vol%, significando oferta de oxigênio livre vinte vezes maior; o que teoricamente viabilizaria a atividade celular sem a presença da hemoglobina. Este efeito de hiperóxia secundário é um dos principais mecanismos de ação dessa modalidade terapêutica (Grim et al., 1990).

A OH é uma modalidade terapêutica consagrada no tratamento de doenças associadas à deficiência de oxigenação tecidual. As principais indicações de OH reconhecidas pelo Conselho Federal de Medicina (Resolução CFM 1.457/95) são 1. embolia gasosa, 2. doenças descompressivas, 3. embolias traumáticas pelo ar, 4. envenenamento por monóxido de carbono ou inalação de fumaça, 5. envenenamento por cianeto ou derivados cianídricos, 6. gangrena gasosa, 7. síndrome de Fournier, 8. outras infecções necrotizantes de tecidos moles: celulites, fasciites e miosites, 9. isquemias agudas traumáticas: lesão por esmagamento, síndrome compartimental, reimplantação de extremidades amputadas, 10. vasculites agudas de etiologia alérgica, medicamentosa ou por toxinas biológicas (aracnídeos, ofídeos, insetos), 11. queimaduras térmicas e elétricas, 12. lesões refratárias: úlceras de pele lesões de pé diabético, escaras de decúbito, úlceras por vasculite auto-imune, deiscência de suturas, 13. lesões por radiação: radiodermite, osteorradionecrose e lesões actínicas de mucosas, 14. retalhos ou enxertos comprometidos ou de risco, 15. osteomielites, 16. anemia aguda, nos casos de impossibilidade de transfusão sanguínea.

Apesar de não reconhecida pelo Conselho Federal de Medicina, a utilização do oxigênio hiperbárico em hepatopatias tem se mostrado uma linha de pesquisa promissora.

Estudos experimentais e relatos da aplicação clínica desta técnica mostram resultados animadores em situações como hepatites crônicas virais (Liu et al., 2002), insuficiência hepática pós-operatória em cirróticos (Nazyrov et al., 2002), isquemia arterial pós transplante hepático (Mazariegos et al., 1999), hepatite aguda fulminante (Ponikvar et al., 1998), hipertrofia hepática pós embolização portal e hepatectomia parcial (Ozden et al., 2004).

Estudos experimentais sobre aplicação da OH no tratamento e prevenção da lesão de isquemia e reperfusão de órgãos como os testículos (Kolski et al., 1998) e intestino delgado (Yamada et al., 1995) demonstraram claramente os efeitos protetores do oxigênio em altas pressões.

Estudo experimental em ratos evidenciou efeitos protetores da OH na lesão da isquemia e reperfusão do fígado (Chen, 1998). Neste experimento, a exposição dos animais a 90 minutos de oxigenoterapia a 2,5 atm, imediatamente antes da clampagem total do pedículo hepático por 1 hora, seguida por um período de 2 horas de reperfusão, evidenciou uma atenuação do número de leucócitos aderentes aos sinusóides e vênulas pós-sinusoidais, uma menor concentração tissular hepática de malondialdeído e maior preservação da concentração de ATP tissular, quando comparado ao grupo submetido à isquemia e reperfusão sem exposição prévia à oxigenoterapia. Neste estudo, o nível sérico de ALT e AST pós-reperfusão foi similar entre o grupo tratado e não tratado.

Os efeitos benéficos celulares e moleculares da OH incluem: promoção da angiogênese e cicatrização de feridas, impedir o crescimento de certas espécies de *Pseudomonas* e a produção de toxina A pelo *Clostridium*, restaurar a atividade bactericida dos neutrófilos em tecidos com hipóxia e redução da adesão de leucócitos na lesão de reperfusão, diminuindo a liberação de proteases e de radicais livres de oxigênio, responsáveis pela vasoconstrição e lesão celular (Leach et al., 1998). A OH tem efeitos atenuadores na aderência endotelial dos neutrófilos após lesão de isquemia e reperfusão, pela menor expressão de ICAM-1 nas células endoteliais (Hong et al., 2003).

Apesar de seus conhecidos efeitos benéficos, a OH pode gerar danos orgânicos irreversíveis. Altas concentrações de oxigênio causam a redução do fluxo sanguíneo (Hordnes e Tysseboth, 1995). Os efeitos tóxicos do oxigênio para o pulmão têm relação direta com o tempo de exposição, com sua concentração e se

expressam clinicamente por diminuição do volume expirado (Thorsen et al. 1998). Como os pacientes raramente permanecem por mais de duas horas em tratamento nos protocolos de OH, o risco de lesões tóxicas pelo oxigênio é baixo.

Os efeitos colaterais da OH se devem à variação de pressão e/ou toxicidade do oxigênio. São relatados os seguintes efeitos: 1. toxicidade pulmonar: tosse seca, dor retroesternal, hemoptóicos e edema pulmonar; 2. toxicidade neurológica: parestesias e convulsão (1:10.000 tratamentos); 3. desconforto e barotrauma auditivos; 4. desconforto em seios da face; 5. alterações visuais transitórias. A OH apresenta as seguintes contra-indicações: 1. absolutas: uso de drogas (doxorubicina, dissulfiran, cisplatina, sulfamylon), pneumotórax não tratado; 2. relativas: infecções das vias aéreas superiores, DPOC com retenção de CO<sub>2</sub>, hipertermia, história de pneumotórax espontâneo, cirurgia prévia em ouvido, esferocitose congênita, infecção viral em fase aguda, gravidez. (Rodrigues e Marra, 2004).

Alguns estudos demonstraram que o tratamento hiperbárico imediatamente após eventos isquêmicos diminui os fenômenos deletérios secundários à síndrome de reperfusão de forma sistêmica e não apenas local (Nylander et al., 1985, Zamboni et al., 1993, Costa-Val et al., 2006). Nestes estudos, em apenas uma hora após o emprego da oxigenoterapia hiperbárica em ratos, ocorreu redução da agregação leucocitária no endotélio venoso, as paredes venosas da musculatura esquelética apresentaram-se livres e bem definidas histologicamente dos fenômenos de reperfusão e houve inibição da isquemia causada pela vasoconstrição microarteriolar, que ocorre após eventos de reperfusão. O tempo de início da oxigenoterapia hiperbárica é importante, uma vez que a hiperóxia altera as vias bioquímicas responsáveis pela produção de radicais livres em favor de produtos menos tóxicos aos tecidos, além de reduzir a ativação endotelial, o que diminui a atração dos neutrófilos. Outro mecanismo pelo qual a oxigenoterapia hiperbárica atua sobre os neutrófilos se dá por meio da seqüestração preferencial dos neutrófilos primários em órgãos mais sensíveis a hiperóxia, tais como os pulmões, o que inibe a liberação dessas células na corrente sangüínea. A oferta de O<sub>2</sub> em altas doses diminui a produção da enzima superóxido dismutase, originada durante eventos isquêmicos, sendo responsável pela produção de outros radicais livres e tóxicos para a biologia celular.

Os efeitos bioquímicos e celulares da OH na lesão de isquemia e reperfusão do fígado ainda não estão esclarecidos. Inicialmente, acreditava-se que a OH poderia exacerbar as lesões por aumentar a oferta de oxigênio ao organismo, gerando aumento de espécies reativas de oxigênio (Benke, 1988). Posteriormente, demonstrou-se que a oxigenoterapia hiperbárica, durante a reperfusão, tem efeitos benéficos (Kaelin et al., 1990).

Neste trabalho, pretendemos avaliar os efeitos da OH, realizada após um período de sessenta minutos de isquemia normotérmica e reperfusão, utilizando um parâmetro não descrito na literatura: a avaliação da microcirculação hepática pela ultra-sonografia contrastada com microbolhas. Acrescentamos também parâmetros clássicos: a integridade hepatocelular, avaliada pelos níveis séricos de aminotransferases e LDH, e a morfologia hepática.

### **3- Objetivos**

Avaliar os efeitos da OH, após isquemia hepática segmentar normotérmica e reperfusão, em coelhos, pela análise da:

- microcirculação hepática, medida pela ultra-sonografia com contraste de microbolhas;
- integridade hepatocelular, medida pelos níveis séricos de AST, ALT e LDH;
- alterações morfológicas do fígado.

## **4- Método**

Este trabalho foi realizado com aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/ UFMG), conforme protocolo nº 60/2007 (ANEXO 1).

### **4.1 Animais**

Foram utilizados 22 coelhos machos da raça Nova Zelândia, com idade entre três e quatro meses, com peso médio de 2.750 g, provenientes da Fazenda Experimental de Veterinária da UFMG (Igarapé-MG).

Os animais foram mantidos no Biotério Central da Faculdade de Medicina da UFMG, onde receberam ração balanceada própria para coelhos (Nature Multivita<sup>®</sup>, Socil Gyomarc H) e água potável *ad libitum*. No biotério, foi respeitado o ritmo circadiano dos animais e mantidas condições sanitárias adequadas. Os animais foram alojados em gaiolas individuais.

### **4.2 Divisão dos grupos**

Os animais foram separados, aleatoriamente, em dois grupos e submetidos aos seguintes procedimentos:

- Grupo Controle (n=10): Laparotomia, isquemia hepática segmentar, normotérmica, por 60 minutos, reperfusão, ultra-sonografia com contraste de microbolhas 24 horas após a reperfusão.
- Grupo OH (n=12): Laparotomia, isquemia hepática segmentar, normotérmica, por 60 minutos, reperfusão, tratamento com OH por 60 minutos, ultra-sonografia com contraste de microbolhas 24 horas após a reperfusão.

## **4.3 Procedimento cirúrgico**

### **4.3.1 Técnica anestésica**

Cada coelho foi pesado e anestesiado pela aplicação de cloridrato de xilasina a 2% (Anasedan<sup>®</sup> 2%, Divisão Vetbrands Saúde Animal) na dose de 15 mg/kg e cloridrato de quetamina a 5% (Vetanarcol<sup>®</sup> 5%, König Brasil) na dose de 90mg/kg, por via intramuscular, na coxa esquerda. Os animais foram considerados anestesiados quando havia perda dos reflexos córneo-palpebral e de retirada ao estímulo doloroso provocado por preensão da pata traseira.

Doses adicionais de anestésicos foram usadas durante o procedimento operatório, quando o coelho expressava sinais de recuperação dos reflexos citados.

### **4.3.2 Técnica operatória**

Os animais foram posicionados em decúbito dorsal horizontal. Foi realizada degermação da região abdominal e região interna da coxa direita com solução de polivinilpirrolidona iodo a 1% (Cincord Sul Química e Farmacêutica, Riberão Preto, SP).

Foi realizada incisão na região interna da coxa direita para dissecação, isolamento e canulação de veia superficial da coxa com cateter de polipropileno PE 10 (0,60mm x 0,28mm, Clay Adams, Becton Dickinson, Sparks, MD, EUA), previamente heparinizado, para coleta de sangue e infusão de medicamentos e solução salina 0,9%.

Foi realizada exposição da cavidade peritoneal por incisão longitudinal de cinco centímetros de extensão, na linha mediana, iniciada no apêndice xifóide, por planos, com tesoura.

Os lobos laterais, médio e maior do fígado foram identificados e liberados por divulsão dos ligamentos hepáticos e do estômago.

O pedículo dos lobos médio e maior foi clampado por 60 minutos, utilizando um clampe vascular tipo "Bulldog" de oito milímetros (Quinelato- QZ.317-08). Após este período, foi realizada a reperusão hepática pela retirada do clampe vascular. A laparorráfia foi realizada em dois planos, com pontos contínuos de mononylon 3.0 e

os animais foram encaminhados à câmara de OH (grupo OH) ou permaneceram nas gaiolas individuais, no biotério (grupo controle).

Durante todo o procedimento operatório foi realizada hidratação venosa com solução salina 0,9% na dosagem de 100 mL/kg/h.

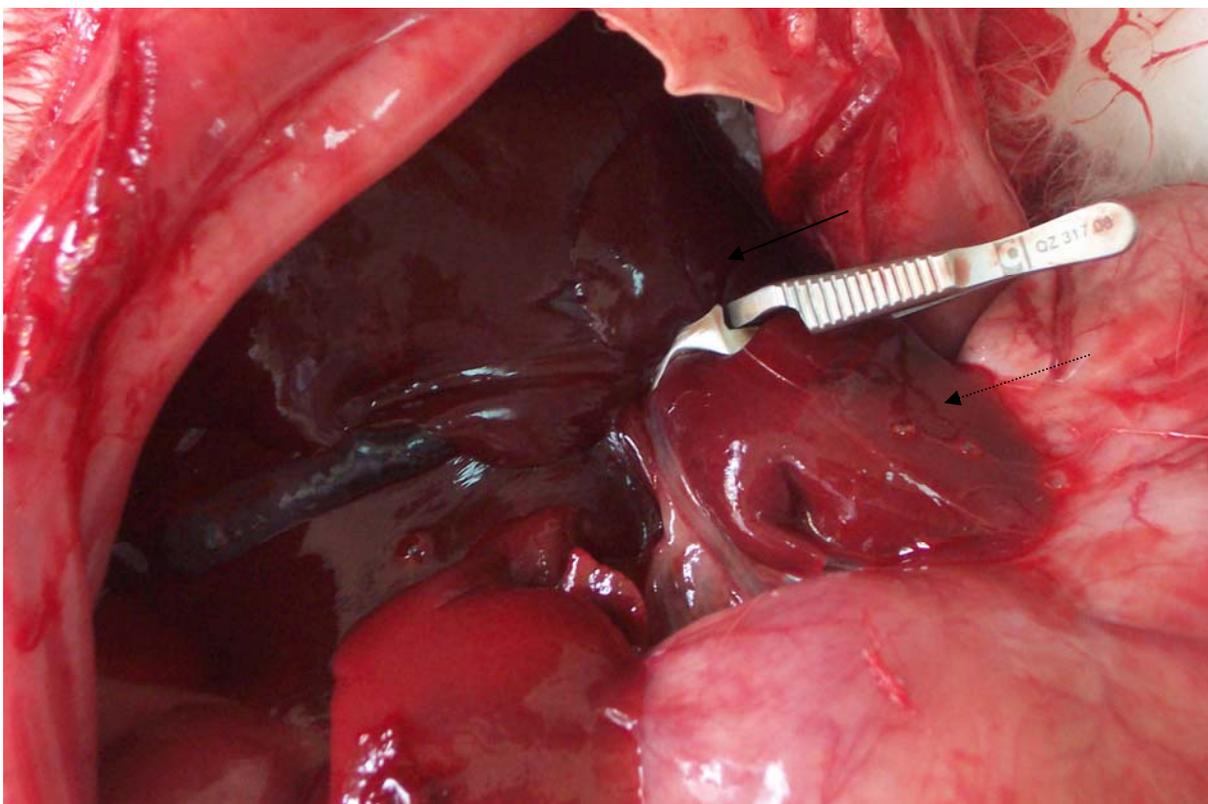


FIGURA 1- Pedículo dos lobos médio e maior clampado com clamp vascular tipo "Bulldog". O parênquima clampado está isquêmico (seta cheia), restante do fígado de aspecto normal (seta pontilhada).

#### **4.4 Oxigenoterapia hiperbárica**

As sessões de OH foram realizadas trinta a quarenta minutos após a reperfusão, em câmara hiperbárica multiplace (Seaway Diver Ind. Met. e Mont. LTDA, ano de fabricação 2000), após transporte dos coelhos do biotério ao centro de oxigenoterapia hiperbárica.

No interior do equipamento, os animais foram colocados, individualmente em gaiolas de plástico de 30,0 cm x 44,0 cm x 16,0 cm, revestida de campânula com dois orifícios, um para entrada e outro para saída do oxigênio a 100%, que era administrado em fluxo intermitente.

Os animais foram colocados em oxigenoterapia a 2,5 atmosferas absolutas por um período de 60 minutos. A compressão e a descompressão foram realizadas lentamente, a razão em torno de 0,2 atmosferas absolutas por minuto, com duração de 15 minutos cada. O tempo total da sessão foi de 90 minutos.

Após a sessão, os animais foram mantidos em gaiolas individuais no biotério.



FIGURA 2- Câmara hiperbárica multiplace Seaway Diver. Volume total 16,60 m<sup>3</sup>.  
Peso vazio 9.500 Kg. Ano de fabricação 2000.



FIGURA 3- Parte interna da câmara hiperbárica multiplace.

#### **4.4 Avaliação ultra-sonográfica**

Após 24 horas da reperfusão, os coelhos foram novamente anestesiados, de acordo com a técnica descrita acima, para realização da ultra-sonografia com contraste.

A avaliação ultra-sonográfica foi realizada com aparelho GE Logiq 7 Classe A, com transdutor 7L, com frequência 8,0 MHz na fase basal e frequência 6,5 MHz na fase contrastada.

Inicialmente, foi realizada ultra-sonografia basal, sem contraste, para avaliação da ecogenicidade do parênquima hepático. A seguir, o contraste foi administrado por punção intra-cardíaca, guiada por ultra-sonografia com cateter intravascular periférico Jelco<sup>®</sup> 24G (Medex Medical Ltd, Inglaterra).

Utilizou-se o contraste Definity<sup>®</sup>, constituído de perfluoropropano, que foi ativado por Vialmix<sup>®</sup> (aparelho de ativação), na dose de 0,1 mL/ kg, diluído para um volume total de 1,0 mL e administrado em *bolus*.

Parâmetros avaliados:

- A) Exame basal: avaliada a ecogenicidade do parênquima hepático (hipoecogênico, heterogêneo, normal). As regiões hipoecogênicas foram medidas em seus dois maiores diâmetros, que foram multiplicados um, pelo outro, para cálculo, aproximado, de sua área. Quando havia mais de uma região hipoecogênica, suas áreas eram somadas para calcular o tamanho total.
- B) Exame contrastado: avaliou-se a perfusão do parênquima hepático e procurou-se regiões com alteração de perfusão. Os dois maiores diâmetros destas regiões foram medidos e feita multiplicação para cálculo da área. O padrão de perfusão foi classificado como mosaico, sem perfusão ou normal. E as bordas da lesão foram classificadas como bem delimitadas ou mal delimitadas.

O índice mecânico utilizado variou de 0,22 a 0,31, a fim de que se fosse obtida a melhor resolução possível.



FIGURA 4- Ultra-sonografia com contraste de microbolhas. Fígado com perfusão microvascular homogênea

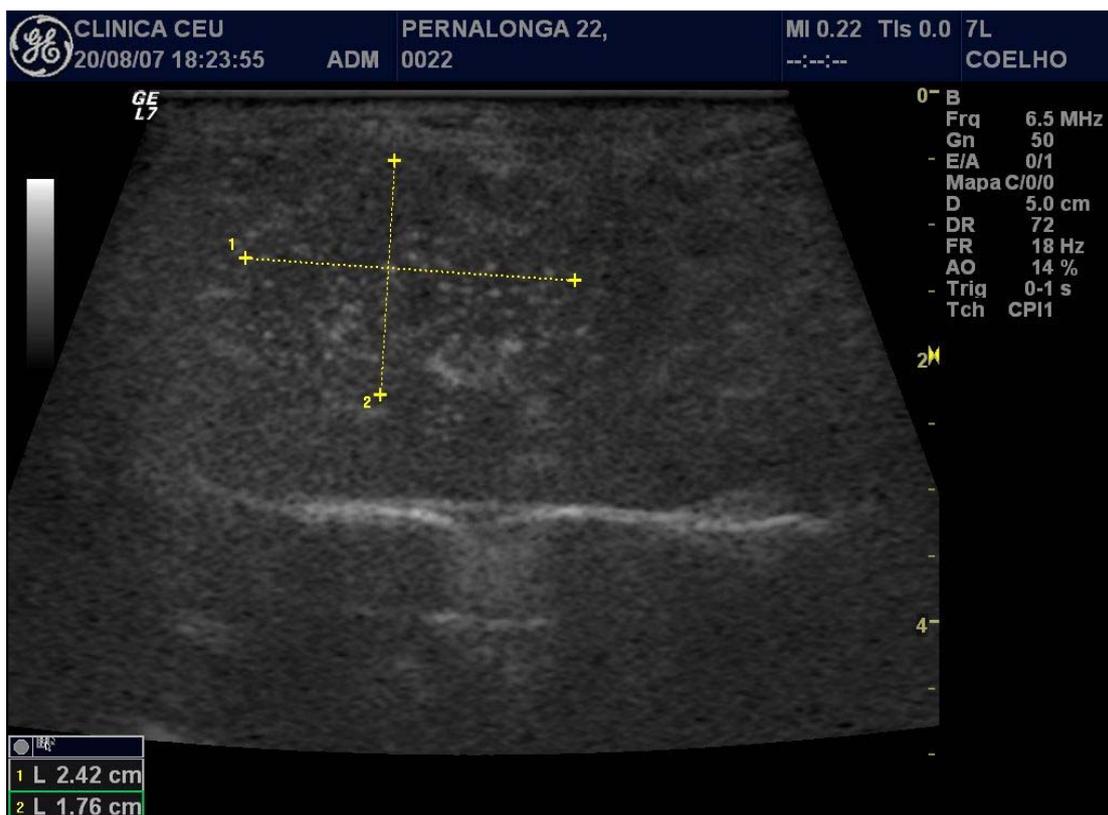


FIGURA 5- Ultra-sonografia com contraste de microbolhas. Área com alteração de perfusão, com padrão em mosaico, medida em seus dois maiores diâmetros.

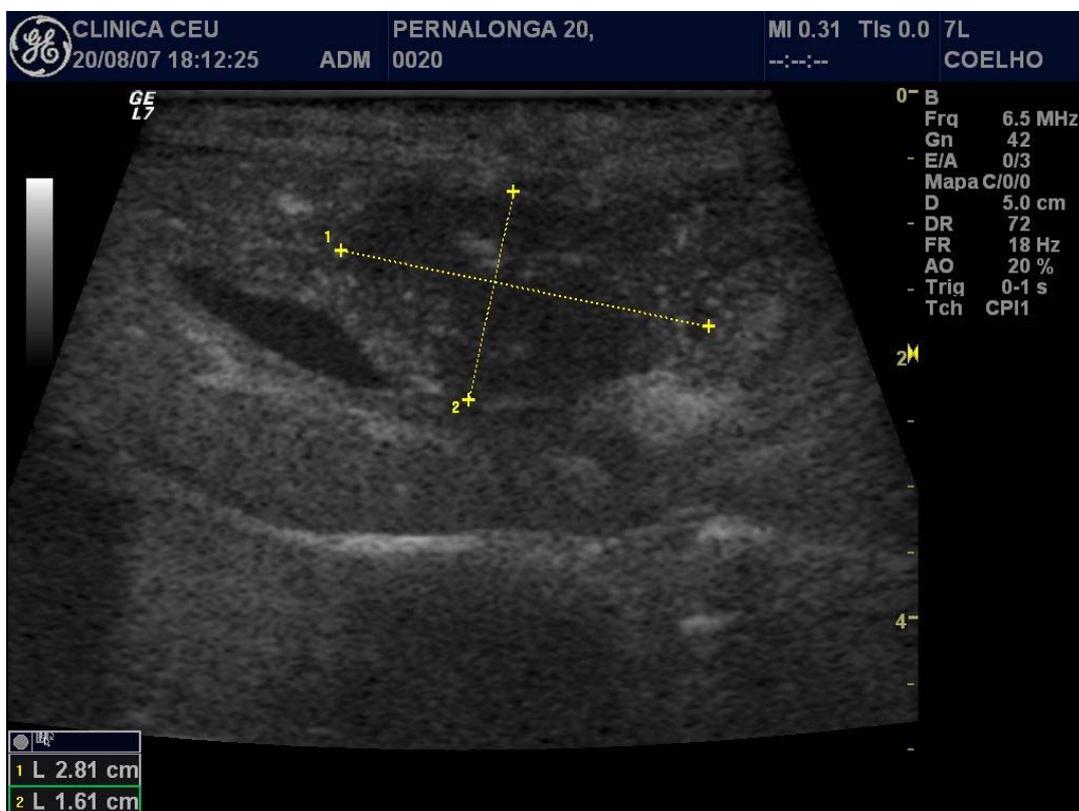


FIGURA 6- Ultra-sonografia com contraste de microbolhas. Área sem perfusão central, medida em dois diâmetros, ao lado da vesícula biliar.

#### **4.6 Colheita de sangue**

Foram colhidos, pelo cateter introduzido na veia superficial da coxa direita, 1,2mL de sangue venoso dos animais de cada grupo, imediatamente antes da clampagem do pedículo hepático (basal), dez minutos após a desclampagem (reperusão) e 24 horas após a reperusão hepática (tardio). Cada amostra de sangue foi submetida a microcentrifugação a 3.000 rpm durante 10 minutos, a 4°C para separação do plasma. As amostras de plasma foram acondicionadas e submetidas a resfriamento a -80°C para posterior análise bioquímica.

#### **4.7 Avaliação bioquímica do sangue**

As alterações bioquímicas decorrentes da lesão de isquemia e reperusão do fígado foram quantificadas pelas dosagens séricas de AST, ALT e LDH, pelo método cinético otimizado por ultravioleta, em aparelho Cobas Mira Plus, Roche.

#### **4.8 Avaliação morfológica**

Os animais foram mortos por secção da veia cava e aorta infra-hepática, após realização da ultra-sonografia com contraste. Realizou-se a exérese total do fígado, que foi acondicionado em frasco com solução de formalina a 10% para posterior avaliação morfológica.

Foi realizada avaliação macroscópica da superfície hepática e secção do parênquima em cortes longitudinais, com espaçamento de 8 a 10 mm, para identificação de áreas de necrose intra-parenquimatosa.

Os critérios macroscópicos de necrose incluíram áreas de palidez, circundadas por áreas de hemorragia. Estas regiões foram medidas em seus dois maiores diâmetros, que foram multiplicados para cálculo, aproximado, de sua área. Estas áreas calculadas foram somadas, quando presentes em mais de um lobo.

Quatro amostras de tecido hepático, colhidas nas bordas e dentro das áreas de necrose macroscópica, foram processadas para inclusão em parafina e

confeccionadas lâminas (cortes de 5  $\mu\text{m}$ ), que foram coradas com hematoxilina-eosina (HE) e codificadas.

Os critérios morfológicos da microscopia incluíram eosinofilia citoplasmática, vacuolização, ruptura celular, perda da arquitetura e alterações nucleares que consistiam em picnose, cariorexe ou cariólise, utilizados para determinar necrose.

A necrose foi classificada como: esparsa (raros hepatócitos necróticos, espalhados pelo parênquima), focal (periportal, perivenular ou médio acinar) ou maciça (multifocal ou com traves entre estruturas vasculares aferentes e eferentes).

A degeneração hidrópica foi classificada como ausente ou presente (leve ou acentuada).

A avaliação histológica foi realizada por um único patologista, que não recebeu informações prévias sobre a codificação dos grupos dos animais.

#### **4.9 Análise estatística**

O comportamento de cada variável quantitativa, a distribuição das médias e das medianas e a variabilidade foram avaliados pelos gráficos de caixa – boxplot.

Com o intuito de averiguar se existia diferença de locação entre os tipos de amostra das variáveis quantitativas, realizou-se o teste de Wilcoxon e o teste de Mann-Whitney. Esses testes não-paramétricos foram utilizados devido à não normalidade de algumas variáveis.

O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparar populações com base em amostras dependentes, que nesse estudo foram os exames bioquímicos a que os coelhos foram submetidos em diferentes momentos (basal, reperfusão e tardio).

Já o teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar populações com base em amostras independentes, grupo controle e grupo OH, selecionados aleatoriamente.

A fim de verificar o grau de associação linear entre as variáveis quantitativas, área hipocócica definida determinada pela ultra-sonografia basal, área de necrose macroscópica e área com alteração de perfusão determinada pela ultra-sonografia com contraste foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Este teste não-paramétrico foi utilizado devido a não normalidade das variáveis em questão.

Para avaliação da associação existente entre duas variáveis qualitativas, utilizou-se o teste Qui-quadrado. Nos casos em que o tamanho amostral não foi suficientemente grande para que as frequências esperadas fossem todas maiores que cinco, utilizou-se o teste exato de Fisher. O valor de  $p$  para este teste foi calculado através de Simulações de Monte Carlo.

Foi utilizado o programa SPSS 15.0 para elaboração de gráficos e análises estatísticas. O nível de significância adotado foi  $p \leq 0,05$ .

## 5. Resultados

### 5.1 Comparação do peso e dos exames bioquímicos, nos diferentes tempos de medida, entre os grupos controle e oxigenoterapia hiperbárica

Foram realizados testes de comparação do peso e dos exames bioquímicos, nos diferentes tempos de medida, entre os dois grupos de estudo, a fim de verificar se estas variáveis apresentam o mesmo comportamento para os coelhos submetidos ou não à OH, logo após a reperusão.

As tabelas 1 a 3 apresentam as estatísticas descritivas para as variáveis peso, AST, ALT e LDH séricas, área hipoecóica definida à ultra-sonografia basal, área com alteração de perfusão definida à ultra-sonografia com contraste, área de necrose macroscópica, divididas por grupo de estudo, além do valor de p encontrado para o teste de Mann-Whitney.

TABELA 1  
Análise descritiva do peso nos grupos controle e OH

	Grupo	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil			Valor p
							25	50	75	
Peso (gramas)	Controle	10	2.891,00	283,10	2.350,00	3.400,00	2.720,00	2.900,00	3.025,00	0,037
	OH	12	2.629,17	234,00	2.300,00	3.000,00	2.462,50	2.575,00	2.875,00	

Teste de Mann-Whitney

OH= oxigenoterapia hiperbárica

TABELA 2

Análise descritiva dos exames bioquímicos nos grupos controle e OH

	Grupo	N	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil			Valor p
							25	50	75	
AST B (UI/L)	Controle	10	20,30	6,88	11,00	30,00	13,50	20,00	27,25	0,164
	OH	12	16,00	4,94	8,00	27,00	13,00	17,00	18,75	
AST R (UI/L)	Controle	10	254,80	188,47	34,00	553,00	101,50	195,00	452,50	0,429
	OH	12	249,00	308,02	15,00	1.098,00	36,50	150,50	389,25	
AST T (UI/L)	Controle	10	641,40	934,33	99,00	3.024,00	133,75	187,50	789,25	0,235
	OH	12	205,58	150,91	43,00	491,00	81,50	158,50	337,25	
ALT B (UI/L)	Controle	10	14,40	22,64	1,00	73,00	2,00	3,50	17,75	0,466
	OH	12	20,00	17,43	1,00	50,00	3,00	16,50	32,25	
ALT R (UI/L)	Controle	10	10,60	9,11	1,00	29,00	2,50	9,00	17,25	0,973
	OH	12	23,08	29,10	1,00	80,00	1,00	4,00	54,50	
ALT T (UI/L)	Controle	10	137,30	141,33	11,00	463,00	33,00	72,50	221,50	0,575
	OH	12	114,83	143,50	18,00	500,00	21,75	65,00	124,75	
LDH B (UI/L)	Controle	10	475,81	283,54	167,00	928,90	242,03	377,90	767,20	0,510
	OH	12	353,28	126,35	116,90	587,90	267,28	370,60	442,05	
LDH R (UI/L)	Controle	10	914,92	705,18	246,20	2.587,20	409,60	811,65	1.244,88	1,00
	OH	12	958,85	726,12	121,00	2.296,90	378,95	754,35	1.642,73	
LDH T (UI/L)	Controle	10	3254,11	2.899,39	540,20	10.304,00	1.504,90	2.171,45	3.994,88	0,114
	OH	12	1.708,13	758,00	874,30	3.727,10	1.094,40	1.595,55	2.102,68	

Teste de Mann-Whitney

ALT= alanina-aminotransferase; AST= aspartato-aminotransferase; LDH= desidrogenase láctica; OH= oxigenoterapia hiperbárica; B= basal; R= reperfusão; T= tardio.

TABELA 3

Análise descritiva das áreas hipocóicas definidas à ultra-sonografia basal, áreas com alteração de perfusão à ultra-sonografia com contraste e necrose macroscópica presentes nos grupos controle e OH

	Grupo	N	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil			Valor p
							25	50	75	
Área hipocóica definida ao US basal (cm <sup>2</sup> )	Controle	10	1,04	1,70	0,00	4,76	0,00	0,22	1,52	0,079
	OH	12	0,10	0,27	0,00	0,90	0,00	0,00	0,00	
Área com alteração de perfusão (cm <sup>2</sup> )	Controle	10	6,27	2,53	2,64	10,27	4,37	5,81	8,77	0,018
	OH	12	3,21	3,14	0,00	10,25	0,55	2,99	5,23	
Necrose macroscópica (cm <sup>2</sup> )	Controle	10	5,16	5,61	0,00	15,00	0,00	4,65	9,89	0,014
	OH	12	0,52	1,27	0,00	4,00	0,00	0,00	0,00	

Teste de Mann-Whitney

US ultra-sonografia; OH oxigenoterapia hiperbárica.

Observa-se que apenas as variáveis peso, área com alteração de perfusão à ultra-sonografia com contraste e área de necrose macroscópica, parecem estar associadas com o tipo de grupo que o coelho pertence. Os valores dos exames bioquímicos e da área hipoecóica definida à ultra-sonografia basal parecem apresentar a mesma distribuição para o grupo controle e o grupo de tratamento com OH.

Os gráficos 1 a 3 ilustram os valores das variáveis que tiveram o p-valor  $\leq 0,05$ .

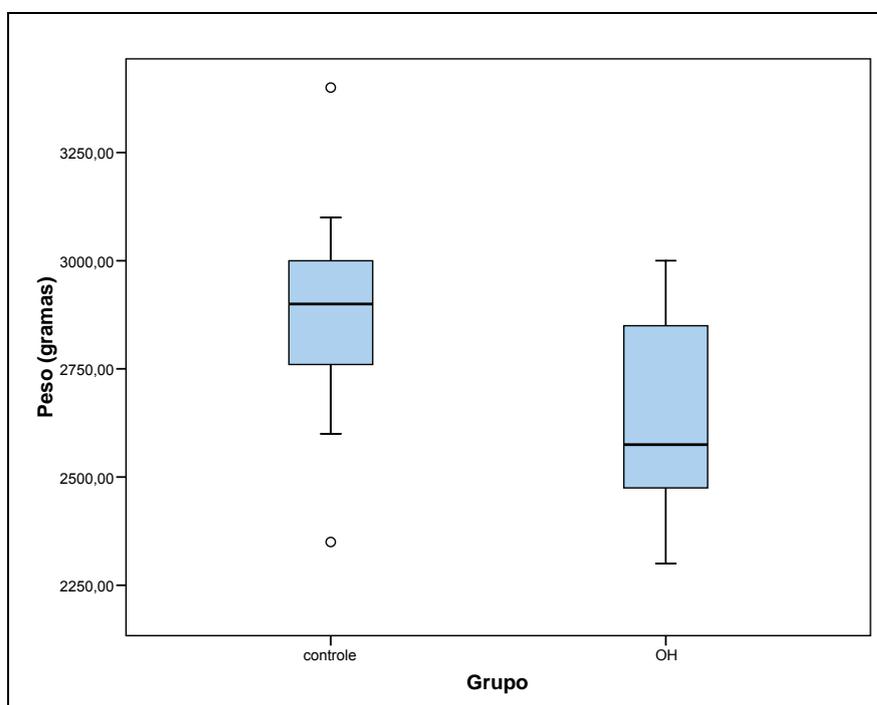


GRÁFICO 1- Distribuição do peso (gramas) para os grupos de estudo

Observa-se que os animais do grupo controle apresentam peso maior, em geral, do que os animais do grupo OH.

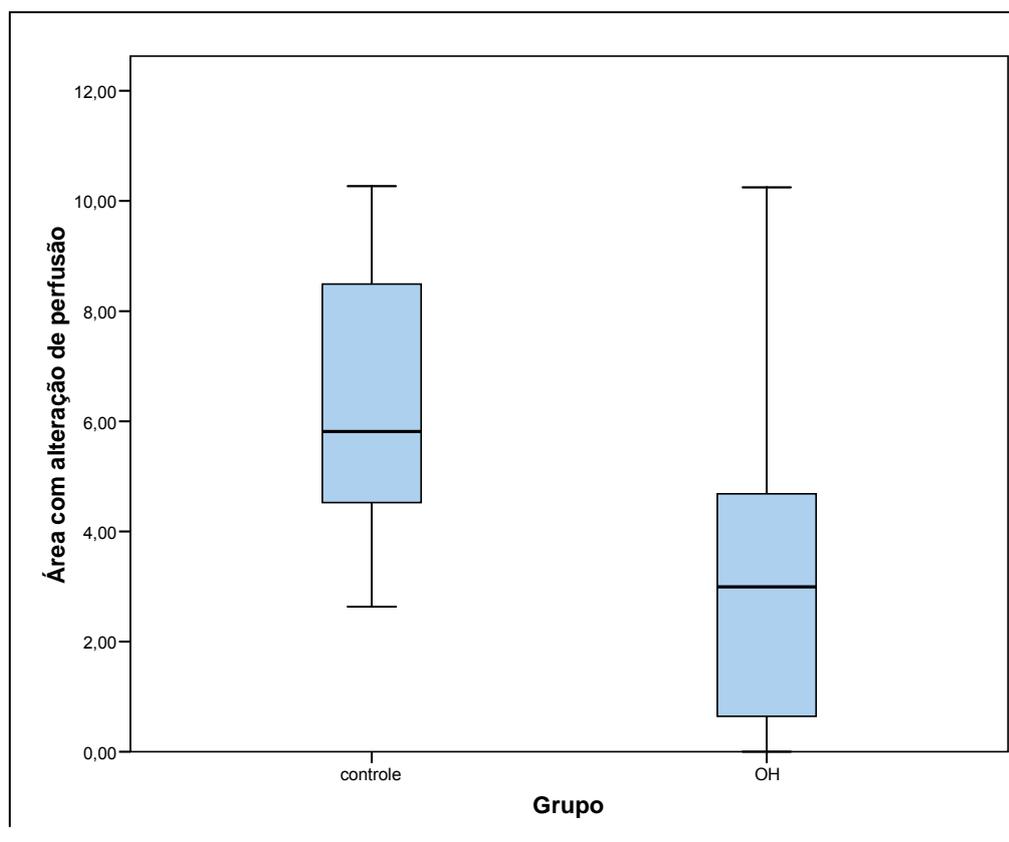


GRÁFICO 2- Distribuição da soma das áreas com alteração de perfusão( $\text{cm}^2$ ), evidenciadas à ultra-sonografia com contraste para os grupos de estudo

Nota-se, com o gráfico 2, que o tamanho das áreas com alteração de perfusão à ultra-sonografia com contraste no grupo controle foram maiores que no grupo OH. Observa-se que 50% dos tamanhos das áreas com alteração de perfusão do grupo OH são menores que a menor área de lesão no grupo controle, existindo forte associação entre estas variáveis.

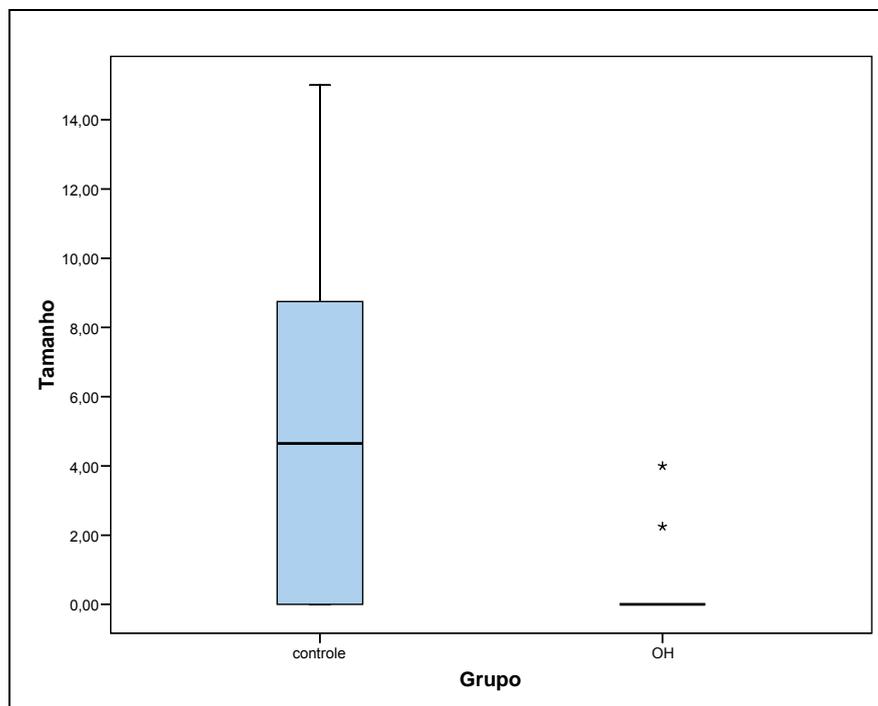


GRÁFICO 3- Distribuição da área de necrose macroscópica (cm<sup>2</sup>) para os grupos de estudo

Nota-se que o tamanho das áreas de necrose macroscópica presentes nos coelhos do grupo controle foram relativamente maiores que nos coelhos em tratamento com OH. Observa-se que o tamanho das áreas de necrose do grupo OH estão bem próximos de zero enquanto 50% dos tamanhos das áreas de necrose no grupo controle são superiores a 4,0 cm<sup>2</sup>, existindo uma associação forte entre essas variáveis.

## 5.2 Comparação de variáveis qualitativas entre os grupos controle e OH

Comparou-se a ecogenicidade do parênquima à ultra-sonografia basal, as bordas da lesão evidenciadas à ultra-sonografia contrastada, o padrão de perfusão do contraste ultra-sonográfico, a frequência de necrose maciça, focal e macroscópica e frequência de degeneração hidrópica, por grupo de estudo, utilizando-se o teste exato de Fisher.

TABELA 4

Avaliação ultra-sonográfica basal da ecogenicidade do parênquima hepático, por grupo de estudo (n=22)

Ecogenicidade do parênquima hepático	Grupo		Total
	Controle n(%)	OH n (%)	
Hipoecogênico	5 (50,0%)	2 (16,7%)	7 (31,8%)
Levemente heterogêneo	3 (30,0%)	7 (58,3%)	10 (45,5%)
Normal	2 (20,0%)	3 (25,0%)	5 (22,7%)
Total	10 (100,0%)	12 (100,0%)	22 (100,0%)

Valor de p= 0,303 (Teste exato de Fisher)

Conforme o valor de p obtido, concluímos que não existe associação entre a ecogenicidade do parênquima hepático identificada à ultra-sonografia basal e o tratamento ou não com OH.

TABELA 5

Avaliação ultra-sonográfica com contraste das bordas das áreas de lesão, por grupo de estudo (n=22)

Bordas da área de lesão ao US com contraste	Grupo		Total
	Controle n (%)	OH n (%)	
Bem delimitadas	5 (50,0%)	2 (16,7%)	7 (31,8%)
Mal delimitadas	5 (50,0%)	9 (75,0%)	14 (63,6%)
Sem lesão	0 (0,0%)	1 (8,3%)	1 (4,6%)
Total	10 (100,0%)	12 (100,0%)	22 (100,0%)

Valor de p= 0,177 (Teste exato de Fisher)  
US ultra-sonografia

Nota-se com o p-valor obtido que não existe associação entre o fato da borda da área de contraste estar bem ou mal delimitada com o fato do coelho pertencer ou não ao grupo de tratamento com OH.

TABELA 6

Freqüência do padrão de perfusão do contraste na área de lesão identificada à ultra-sonografia, por grupo de estudo (n=22)

Padrão de perfusão do contraste ultra-sonográfico	Grupo		Total
	Controle n (%)	OH n (%)	
Normal	0 (0,0%)	1 (8,3%)	1 (4,5%)
Mosaico	7 (70,0%)	10 (83,4%)	17 (77,3%)
Sem perfusão	3 (30,0%)	1 (8,3%)	4 (18,2%)
Total	10 (100,0%)	12 (100,0%)	22(100,0%)

Valor de p= 0,301 (Teste exato de Fisher)

Pode-se dizer com base no valor de p obtido que não existe associação entre o padrão de perfusão do contraste na área de lesão com o grupo de estudo a que o coelho pertence.

TABELA 7

Freqüência de necrose macroscópica por grupo de estudo (n=22)

Presença de necrose macroscópica	Grupo		Total
	Controle n(%)	OH n (%)	
Não	4 (40,0%)	9 (75,0%)	13 (59,0%)
Sim	6 (60,0%)	3 (25,0%)	9 (41,0%)
Total	10 (100,0%)	12 (100,0%)	22(100,0%)

Valor de p= 0,275 (Teste exato de Fisher)

A partir da Tabela 7 e do valor de p obtido no teste exato de Fisher, conclui-se que não existe associação entre o fato do coelho apresentar ou não necrose macroscópica ou ter necrose macroscópica periférica, com o grupo a que ele pertence.

TABELA 8

Freqüência de necrose maciça à microscopia, por grupo de estudo (n=22)

Necrose maciça à microscopia	Grupo		Total
	Controle n (%)	OH n (%)	
Ausente	4 (40,0%)	6 (50,0%)	10 (45,5%)
Esparsa	2 (20,0%)	2 (16,7%)	4 (18,2%)
Extensa	4 (40,0%)	4 (33,3%)	8 (36,3%)
Total	10 (100,0%)	12 (100,0%)	22(100,0%)

Valor de p= 1,000 (Teste exato de Fisher)

Pode-se dizer, com os resultados apresentados anteriormente, que a presença e extensão (esparsa ou extensa) de necrose maciça à microscopia independe do grupo de estudo a que o coelho pertence.

Tabela 9

Frequência de necrose focal, à microscopia, por grupo de estudo (n=22)

Presença de necrose focal à microscopia	Grupo		Total
	Controle n (%)	OH n (%)	
Ausente	0 (0,0%)	2 (16,7%)	2 (9,0%)
Esparsa	6 (60,0%)	8 (66,7%)	14 (63,7%)
Extensa	4 (40,0%)	1 (8,3%)	5 (22,8%)
Rara	0 (0,0%)	1 (8,3%)	1 (4,5%)
Total	10 (100,0%)	12 (100,0%)	22(100,0%)

Valor de p= 0,178 (Teste exato de Fisher)

Com os resultados apresentados na Tabela 9, nota-se que a presença e extensão (esparsa, extensa, rara) de necrose focal à microscopia não está associada com os grupos de estudo dos coelhos.

Tabela 10

Frequência de degeneração hidrópica, à microscopia, por grupo de estudo (n=22)

Degeneração hidrópica	Grupo		Total
	Controle n (%)	OH n (%)	
Acentuada	5 (50,0%)	1 (8,3%)	6 (27,3%)
Leve	5 (50,0%)	9 (75,0%)	14 (63,7%)
Moderada	0 (0,0%)	2 (16,7%)	2 (9,0%)
Total	10 (100,0%)	12 (100,0%)	22 (100,0%)

Valor de p= 0,077 (Teste exato de Fisher)

A partir do valor de p obtido, conclui-se que a gravidade da degeneração hidrópica, à microscopia, não apresenta diferença de comportamento entre o grupo controle e o grupo tratamento.

### 5.3 Comparação entre as variáveis quantitativas

Nesta seção, correlacionamos as medidas das áreas hipoeccóicas definidas pela ultra-sonografia basal, das áreas com alteração de perfusão à ultra-sonografia com contraste e das áreas de necrose à macroscopia, utilizando os coeficientes de correlação de Spearman. Para os valores de  $p \leq 5\%$ , foram construídos os gráficos de dispersão das variáveis.

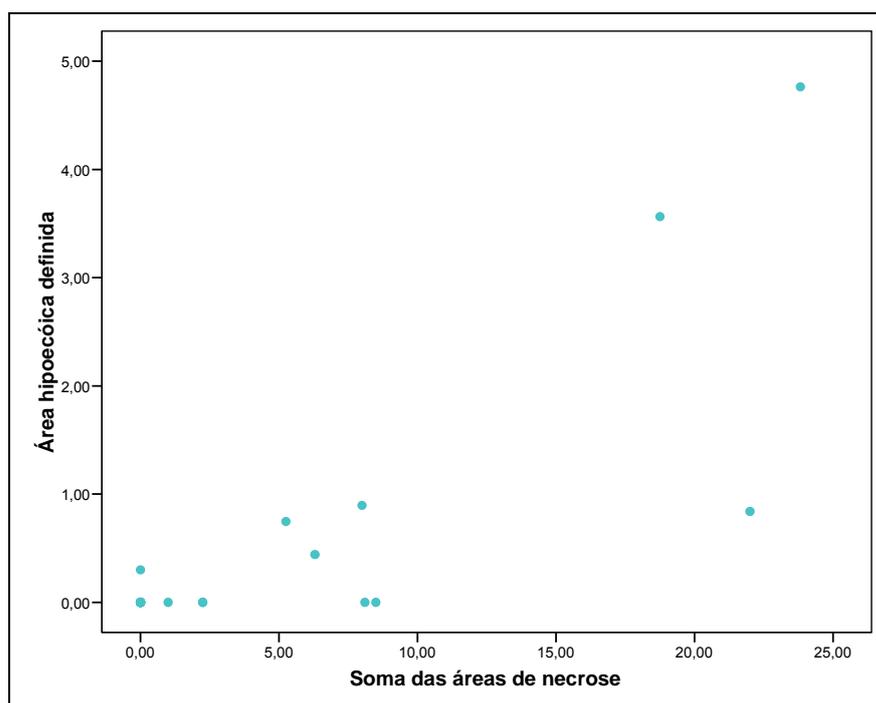
TABELA 11  
 Teste de Spearman para áreas hipoeccóicas definidas à ultra-sonografia basal, áreas com alteração de perfusão à ultra-sonografia contrastada e tamanho das áreas de necrose à macroscopia

		Área hipoeccóica definida ao US basal	Área com alteração de perfusão ao US contrastado	Soma das áreas de necrose macroscópica
Área hipoeccóica definida ao US basal	Coefficiente de correlação	1,000	0,371	0,671**
	Valor p		0,089	0,001
	n	22	22	22
Área com alteração de perfusão ao US contrastado	Coefficiente de correlação	0,371	1,000	0,346
	Valor p	0,089		0,114
	N	22	22	22
Soma das áreas de necrose macroscópica	Coefficiente de correlação	0,671**	0,346	1,000
	Valor p	0,001	0,114	
	N	22	22	22

\*\*Correlação significativa ao nível 0,001  
 US- ultra-sonografia

A partir da tabela 11 conclui-se que a área hipoeccóica definida à ultra-sonografia basal está correlacionada positivamente com a presença de necrose macroscópica. Por sua vez, nota-se que o tamanho da área com alteração de perfusão delimitada pela ultra-sonografia com contraste não apresenta nenhuma associação significativa com as demais variáveis.

A associação entre as variáveis destacadas anteriormente pode ser visualizada no gráfico a seguir. Com ele, é possível verificar que valores menores de uma variável tendem a ficar com os valores mais baixos da outra variável, o mesmo ocorrendo para os valores maiores. Além disso, observa-se que se pode ajustar uma possível reta para os pontos plotados no gráfico.



Coefficiente de correlação de Spearman = 0,671

GRÁFICO 4: Gráfico de dispersão para área hipocócica definida à ultra-sonografia basal e soma da área de necrose macroscópica

#### **5.4 Comparação entre as variáveis qualitativas**

Nesta seção, correlacionamos a presença de necrose macroscópica com a ecogenicidade do parênquima hepático avaliada pelo ultra-som basal e o padrão de perfusão das lesões evidenciadas com contraste ultra-sonográfico com a presença de necrose focal ou maciça e degeneração hidrópica.

TABELA 12

Comparação entre presença de necrose macroscópica e ecogenicidade do parênquima hepático à ultra-sonografia basal (n=22)

Necrose macroscópica		Ecogenicidade do parênquima			
		hipoecogênico	heterogêneo	Normal	Total
Não	n	1	8	4	13
	% por necrose macroscópica	7,7%	61,5%	30,8%	100,0%
	% por ecogenicidade	14,3%	80,0%	80,0%	50,0%
Sim	n	6	2	1	9
	% por necrose macroscópica	66,7%	22,2%	11,1%	100,0%
	% por ecogenicidade	85,7%	20,0%	20,0%	40,9%
Total	n	7	10	5	22
	% por necrose macroscópica	31,8%	45,5%	22,7%	100,0%
	% por ecogenicidade	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Valor p = 0,049 (Teste exato de Fisher)

Observa-se, com o valor p obtido, que existe associação entre o fato de o coelho apresentar ou não necrose macroscópica, com a presença de lesões hipoecogênicas intra-parenquimatosas detectadas à ultra-sonografia basal, como demonstrado no gráfico abaixo.

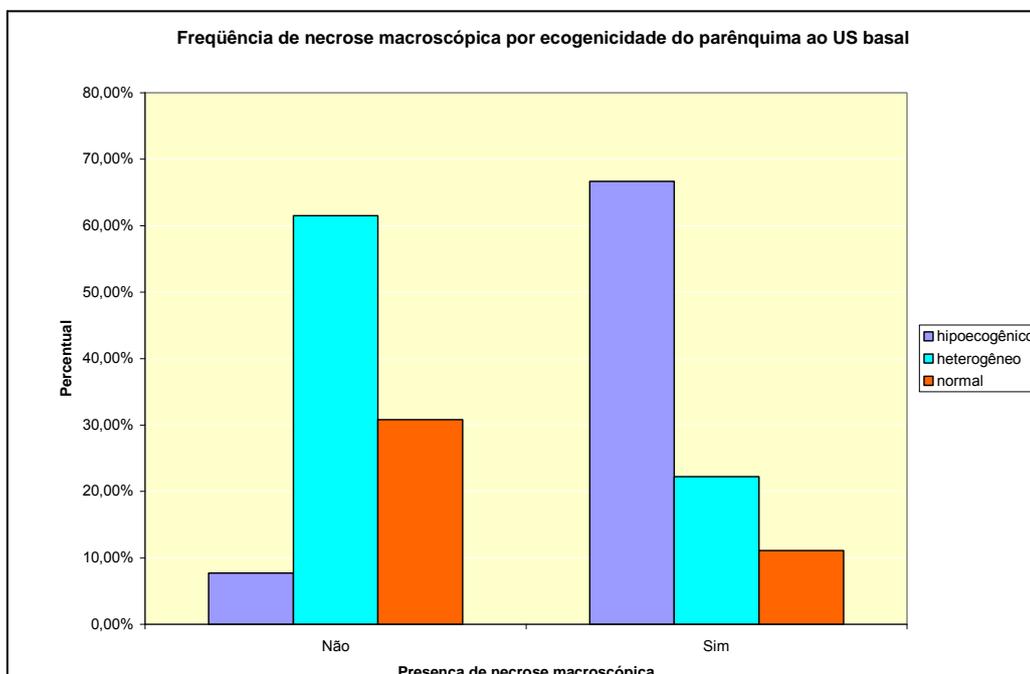


GRÁFICO 5- Frequência de necrose macroscópica por ecogenicidade do parênquima hepático à ultra-sonografia basal

TABELA 13

Comparação entre o padrão de perfusão do contraste no fígado e a presença de necrose maciça à microscopia (n=22)

Padrão de perfusão do contraste nas áreas de lesão		Necrose maciça			Total
		ausente	Esparsa	Extensa	
mosaico	N	9	3	5	17
	% por padrão de perfusão do contraste	52,9 %	17,6 %	29,4 %	100,0%
Normal	N	0	0	1	1
	% por padrão de perfusão do contraste	0,0 %	0,0 %	100,0 %	100,0%
Sem perfusão	N	1	1	2	4
	% por padrão de perfusão do contraste	25,0 %	25,0 %	50,0 %	100,0%
Total	N	10	4	8	22
	% por padrão de perfusão do contraste	45,5 %	18,2 %	36,4 %	100,0%

Valor p=0,625 (Teste exato de Fisher)

O valor p acima indica que o padrão de perfusão do contraste nas áreas de lesão não tem associação com a extensão da necrose maciça diagnosticada à microscopia.

TABELA 14

Comparação entre o padrão de perfusão do contraste nas áreas de lesão e a presença de necrose focal (n=22)

Padrão de perfusão do contraste		Necrose focal				Total
		Ausente	Esparsa	Extensa	Rara	
Mosaico	n	2	10	4	1	17
	% por padrão de perfusão do contraste	11,8 %	58,8 %	23,5 %	5,9 %	100,0%
	% por necrose focal	100,0 %	71,4 %	80,0%	100,0%	77,3 %
Normal	n	0	1	0	0	1
	% por padrão de perfusão do contraste	0,0 %	100,0 %	0,0 %	0,0 %	100,0%
	% por necrose focal	0,0 %	7,1 %	0,0 %	0,0 %	4,5 %
Ausência de perfusão	n	0	3	1	0	4
	% por padrão de perfusão do contraste	0,0 %	75,0 %	25,0 %	0,0 %	100,0%
	% por necrose focal	0,0 %	21,4 %	20,0%	0,0 %	18,2 %
Total	n	2	14	5	1	22
	% por padrão de perfusão do contraste	9,1 %	63,3 %	22,7 %	4,5 %	100,0%
	% por necrose focal	100,0 %	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Valor p = 1,000 (Teste exato de Fisher)

Conforme o valor p apresentado, conclui-se que o padrão de perfusão do contraste não está associado com a extensão da necrose focal.

TABELA 15

Comparação entre o padrão de perfusão do contraste nas áreas de lesão e a presença de degeneração hidrópica (n=22)

Padrão de perfusão do contraste		Degeneração hidrópica			
		Acentuada	Leve	Moderada	Total
Mosaico	n	6	10	1	17
	% por padrão de perfusão do contraste	35,3 %	58,8 %	5,9 %	100,0%
	% por degeneração hidrópica	100,0 %	71,4 %	50,0%	77,3 %
Normal	n	0	1	0	1
	% por padrão de perfusão do contraste	0,0 %	100,0 %	0,0 %	100,0%
	% por degeneração hidrópica	0,0 %	7,1 %	0,0 %	4,5 %
Ausência de perfusão	n	0	3	1	4
	% por padrão de perfusão do contraste	0,0 %	75,0 %	25,0 %	100,0%
	% por degeneração hidrópica	0,0 %	21,4 %	50,0 %	18,2 %
Total	n	6	14	2	22
	% por padrão de perfusão do contraste	27,3 %	63,6 %	9,1 %	100,0%
	% por degeneração hidrópica	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Valor p= 0,430 (Teste exato de Fisher)

Observa-se, com o valor p obtido, que não existe associação entre o padrão de perfusão do contraste, nas áreas de lesão, com a extensão da degeneração hidrópica.

As tabelas com a análise descritiva do peso e dos exames bioquímicos nos diferentes tempos de medida na amostra total de coelhos estão no anexo 2.

No anexo 2, também se encontram as tabelas com a freqüência de necrose macroscópica em lobos maior e médio, por grupo de estudo, além de tabelas com a comparação entre o padrão das bordas das lesões medidas pelo ultra-som contrastado e a presença e extensão de necrose maciça ou focal e de degeneração hidrópica.

## 6. Discussão

A lesão de isquemia e reperfusão hepática é resposta celular, bioquímica e imunológica à privação temporária do fluxo sanguíneo e aporte de oxigênio ao fígado. Baseia-se em interação complexa entre leucócitos, células de Kupffer, plaquetas e células endoteliais sinusoidais, com participação de proteases, lipoperoxidases, mediadores inflamatórios, espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, complemento, entre outros. O grau de lesão é variável, desde leve intensidade até morte celular e necrose.

Buscando inibir as alterações inflamatórias da isquemia-reperfusão, vários métodos cirúrgicos, medicamentosos ou físicos têm sido utilizados: oclusão intermitente do pedículo hepático (Izonaki, 1992; Makuuchi, 1987), pré-condicionamento isquêmico (Lloris-Carsi, 1993), ligadura seletiva intra-hepática do pedículo (Launois e Jamieson, 1992), resfriamento do fígado (Collins, 1969), substâncias anti-oxidantes (Abdo, 2003), inibidores de proteases (Li et al, 1993), imunossuppressores, agonistas de receptores da adenosina, doadores de óxido nítrico como L-arginina (Cottart et al, 1999), pentoxifilina (Rudiger e Clavien, 2002), inibidores de caspatase (Cursio et al, 1999) e inibidores da ação do fator de ativação plaquetária (Boin, 1997).

No presente estudo, a OH foi utilizada para minimizar os efeitos deletérios da isquemia hepática temporária, normotérmica, seletiva, em coelhos. Os efeitos da lesão de isquemia e reperfusão hepática foram avaliados pela integridade celular medida pela concentração sérica de aspartato-aminotransferase (AST), alanina-aminotransferase (ALT) e desidrogenase láctica (LDH), avaliação da microcirculação hepática medida pela ultra-sonografia com contraste de microbolhas, 24 horas após a reperfusão, avaliação das alterações morfológicas do fígado e correlação entre os três métodos.

Optamos por realizar oclusão hepática seletiva para se evitar os efeitos deletérios da oclusão total do pedículo hepático como congestão esplâncnica, com lesão da mucosa intestinal, translocação bacteriana e hipovolemia, não toleradas nesta espécie animal, principalmente por tempo tão prolongado (Kanoria et al., 2004). O método de clampagem utilizado causou isquemia de aproximadamente

70% do fígado e foi bem tolerado por 60 minutos, quando acompanhado de adequada reposição volêmica.

Foi realizada reposição volêmica com solução de cloreto de sódio 0,9%, no volume de 100 mL por quilograma por hora para se evitar que a hipovolemia decorrente de perdas por exposição da cavidade peritoneal, colheitas de sangue, transpiração e diurese pudessem se somar aos efeitos deletérios da isquemia e reperfusão do fígado. São esperadas alterações dos níveis da pressão arterial média após a oclusão do pedículo hepático, mesmo que segmentar, bem como após a reperfusão, já que a interrupção do fluxo sanguíneo hepático causa estase esplâncnica e diminui o retorno venoso para o coração, com conseqüente redução do débito cardíaco. O retorno do fluxo sanguíneo à porção isquemiada do fígado causa liberação de substâncias vasoativas na circulação sistêmica, vasodilatação periférica e diminuição da resistência vascular periférica com conseqüente queda da pressão arterial sistêmica (Lima, 2006). Assim, a reposição volêmica é fundamental para manter a perfusão tecidual e, principalmente, a perfusão renal. Foi utilizada solução eletrolítica sem lactato para não exacerbar a acidose láctica.

Vários estudos foram realizados com diferentes tempos de isquemia, que variaram de 30 minutos a 240 minutos e com tempos e formas de reperfusão variáveis (Boin, 1997; Marubayashi, 1997; Quirenze, 2002). Em todos os modelos, constatou-se alteração das enzimas hepáticas poucos minutos após a reperfusão.

O uso da heparina endovenosa previamente à interrupção do fluxo sanguíneo hepático, como forma de se evitar trombose vascular secundária à hipoperfusão tecidual, é descrito em vários modelos de isquemia e reperfusão hepática no rato (Colleti et al., 1996; Marubayashi et al., 1997). No entanto, estudos recentes não utilizaram esta medida e esta complicação não foi descrita em seus resultados (Peralta et al., 2001). Diante da inexistência de padronização com relação ao seu emprego e como forma de se evitar sangramento per-operatório, optou-se pela não utilização da anticoagulação sistêmica.

A escolha deste modelo animal deveu-se ao maior tamanho dos coelhos em relação aos ratos, permitindo avaliação mais adequada da perfusão do parênquima hepático pela ultra-sonografia com contraste.

A escolha do sexo dos animais se deu com o objetivo de tornar os grupos homogêneos, já que o grau de lesão hepática na isquemia e reperfusão pode variar entre animais de sexos diferentes (Ping, 2005).

O cloridrato de quetamina é um anestésico geral, não barbitúrico. Ele produz estado de anestesia dissociativa que interrompe de forma seletiva os mecanismos de associação do cérebro (córtex e sistema límbico) e caracteriza-se por catalepsia, sedação e analgesia acentuada (Vetanarcol 5%, König Brasil). Ao contrário dos outros anestésicos, os reflexos protetores como o de tosse e deglutição ficam preservados, mantendo as vias aéreas pérvias, o que possibilitou a realização deste estudo sem a necessidade de intubação orotraqueal.

A xilazina é um agente alfa-2 agonista, amplamente empregado em medicina veterinária como sedativo, analgésico e miorelaxante. Os efeitos no sistema nervoso central incluem relaxamento muscular, ataxia, analgesia, sedação e hipnose. A analgesia ocorre principalmente a nível visceral e a intensidade depende da dose aplicada. A sedação e o relaxamento muscular produzidos pela xilazina são bem mais exarcebados do que os gerados por outros agentes anestésicos (Anasedan 2%, Divisão Vetbrands Saúde Animal).

Após a morte celular, ocorrem alterações de permeabilidade da membrana citoplasmática e os componentes celulares são degradados progressivamente, com extravazamento de enzimas celulares para o espaço extracelular. O aumento de aminotransferases e LDH, portanto, fornece parâmetros clínicos importantes de morte celular ( Sherlock e Doosley, 1997).

A AST é uma enzima mitocondrial presente em grande quantidade no coração, fígado, músculo esquelético e rim e seu nível sérico aumenta quando ocorre lesão em qualquer um destes órgãos (Sherlock e Doosley, 1997).

A ALT é uma enzima citosólica presente em maior quantidade no fígado, em relação ao coração e músculo esquelético e seu aumento é indicador mais específico de lesão hepática (Sherlock e Doosley, 1997).

A LDH é uma enzima presente em quase todos os tecidos e sua concentração sérica se eleva em situações de agressão celular. Apresenta alta sensibilidade, porém, baixa especificidade para indicar qual órgão foi acometido (Sherlock e Doosley, 1997).

Neste estudo, os níveis séricos de AST e LDH, medidos 10 minutos após a reperfusão apresentaram aumento significativo em comparação ao período pré-isquêmico, como era esperado. Não houve diferença entre o grupo controle e o grupo OH, uma vez que, até este momento, nenhum grupo recebeu tratamento. Porém, o nível sérico de ALT não apresentou aumento significativo entre o tempo

basal e a reperfusão em nenhum dos dois grupos. Talvez o tempo de 10 minutos entre a reperfusão e o momento da colheita de sangue tenha sido insuficiente. Estudos como o de Lima, 2006, encontraram alteração nos níveis séricos de ALT com 30 minutos de reperfusão.

No tempo tardio, constatou-se aumento significativo da AST, ALT e LDH em relação ao tempo basal. Os elevados níveis de LDH no período tardio poderiam ser explicados pelo intenso processo inflamatório que ocorre na fase tardia (6 a 24 horas), mediado por oxidantes originados de células extra-hepáticas (Cutrin et al., 1998; González-Flecha et al., 1993; Kobayashi e Clamens, 1992). Entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos controle e tratamento com OH. Deste achado, podemos concluir que a OH, aplicada após a reperfusão, não apresenta benefícios, mas também não potencializa a lesão hepatocelular. Yu et al. (2005) estudaram o uso de OH como pré-condicionamento e demonstraram efeito negativo em sua aplicação, porém, utilizaram o nível sérico das enzimas como única variável indicativa de piora da lesão hepatocelular. A hipótese destes autores era de que ocorreria um possível aumento do nível sérico destas enzimas ao término da isquemia, influenciando os resultados após a reperfusão. Em outro estudo, Lima (2006), rejeita esta possibilidade, pois não encontrou alteração no nível de AST e ALT nas amostras sanguíneas colhidas ao término da isquemia, este autor constatou apenas aumento da LDH nos animais submetidos à OH pré-operatória.

O peso dos coelhos foi significativamente maior no grupo controle apesar da distribuição aleatória dos animais entre os grupos. Consideramos que esta diferença não afetou o resultado do estudo uma vez que a histologia não evidenciou sinais de esteatose hepática, as transaminases no tempo basal não foram diferentes e a ultrasonografia basal não identificou, em nenhum animal, ecogenicidade aumentada, sugestiva de infiltração gordurosa hepática.

Estudo experimental em ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática normotérmica evidenciou efeitos protetores do uso da OH até três horas após a reperfusão, expressos por menor infiltração leucocitária hepática e menor mortalidade nos animais tratados (Kihara et al., 2005). Optamos, então, pela realização da oxigenoterapia após a isquemia e avaliamos a infiltração leucocitária hepática por meio de alterações da microcirculação hepática evidenciadas pelo ultrassom com contraste.

Neste estudo, realizou-se a ultra-sonografia basal antes da injeção do contraste de microbolhas para avaliação da homogeneidade e ecogenicidade do parênquima hepático, com medida das áreas de lesões que foram definidas como áreas hipoecóicas. Em relação à área da lesão, vista à ultra-sonografia, não houve, pelo teste de Mann Whitney, diferença entre os grupos controle e OH. Não se constatou, também, diferença significativa entre os grupos quando os resultados do exame ultra-sonográfico foram divididos em variáveis categóricas (parênquima homogêneo, levemente heterogêneo ou hipoecogênico) e avaliados pelo teste de Fisher.

Porém, utilizando-se o coeficiente de correlação de Spearman, constatou-se que a medida do tamanho da área hipoecóica definida ao ultra-som basal correlaciona-se positivamente com a soma do tamanho das áreas de necrose. Estes resultados demonstram que a ultra-sonografia basal, sem contraste, tem baixa sensibilidade para detecção de áreas com alteração da microcirculação ainda sem necrose celular definida, detectando apenas lesões maiores e mais avançadas.

Optamos pelo cálculo da área em lugar do volume das lesões evidenciadas ao ultra-som com o objetivo de reduzir o erro nestes cálculos, uma vez que as superfícies das lesões eram muito irregulares e era difícil medir o diâmetro antero-posterior das mesmas. Além disto, não era possível medir de forma fidedigna o volume da lesão macroscópica, apenas a área, impossibilitando a comparação entre a medida ultra-sonográfica e a macroscopia.

Como citado anteriormente, a isquemia hepática leva a alterações das células endoteliais sinusoidais, que expressam grande número de moléculas de adesão de superfície e antígenos do complexo de histocompatibilidade maior, sensibilizando o endotélio para interrelações posteriores com os polimorfonucleares. Dentre as moléculas expressas nas células endoteliais, merecem destaque as seletinas P e E e a molécula de adesão intercelular-1. Nos polimorfonucleares, destacam-se as integrinas  $\beta 1$  e  $\beta 2$ . A ação conjunta destas moléculas leva a aderência firme entre polimorfonucleares, plaquetas e células endoteliais, causando importante distúrbio microvascular, com extravazamento e migração de células inflamatórias para o tecido lesado (Jaeschke, 1997; Yadav et al., 1999). Após extravazamento e transmigração dos polimorfonucleares, os hepatócitos se aderem a estas células, por intermédio das integrinas  $\beta 2$  e molécula de adesão intercelular-1, expressas nos hepatócitos (Nagendra et al., 1997). Uma vez aderido, o leucócito polimorfonuclear

destrói o hepatócito pela ação de enzimas tóxicas como elastase, serino protease e metaloproteinases, além da produção de espécies reativas de oxigênio.

Além das células endoteliais, outra célula não parenquimatosa envolvida na lesão de isquemia e reperfusão do fígado é a célula de Kupffer. Trata-se de macrófago residente encontrado no espaço sinusoidal. Resistente a isquemia, é ativado durante o período de reperfusão, produzindo espécies reativas de oxigênio, mediadores pró-inflamatórios (interleucina 1, interleucina 6, fator de agregação plaquetária, TNF $\alpha$ , Interferon- $\gamma$ ), aumentando a expressão da molécula de adesão intercelular-1 e seletina-P nas células endoteliais e ativando outras células de Kupffer e neutrófilos circulantes (Hisama et al., 1996; Lentsch et al., 1998; Shigeki e Masayuki, 2000).

A obstrução da microcirculação, decorrente deste desarranjo circulatório e metabólico, torna a tentativa de reperfusão ineficaz. Esse fenômeno, conhecido como "no-reflow" é dependente do tempo de isquemia e pode ser explicado por: obstáculo ao fluxo sangüíneo por edema celular, intersticial ou ambos; auto-regulação inapropriada do fluxo sangüíneo pelo decréscimo na demanda metabólica do tecido pós-isquêmico; perda da capacidade de relaxamento do músculo liso em resposta aos mecanismos fisiológicos ou desvios na produção de fatores implicados na regulação do fluxo sangüíneo pela lesão do endotélio (Miranda et al., 2004).

A reperfusão após período de isquemia resulta em dois efeitos: perda da viabilidade do endotélio dos sinusóides e ativação das células de Kupffer e dos neutrófilos. O primeiro efeito provoca importante distúrbio da microcirculação, aderência de leucócitos e plaquetas, com conseqüente diminuição do fluxo sangüíneo e perpetuação do processo de isquemia. Vasoconstrição, resultante do desequilíbrio entre o efeito do óxido nítrico e endotelinas, agrava o distúrbio da microcirculação (Miranda et al., 2004).

Neste estudo, as alterações microcirculatórias foram avaliadas 24 horas após 60 minutos de isquemia seguida de reperfusão. Olszewer (1995) e Kehrer (1993) definiram uma janela terapêutica na qual o total da lesão tecidual durante o período de hipoperfusão pode ser dividido em dois componentes: aquele que é causado pelo próprio processo isquêmico e aquele que é determinado pela presença das espécies reativas de oxigênio no mecanismo de reperfusão. Em princípio, nenhum dos componentes é forte o suficiente para provocar uma lesão importante, porém, à medida que a isquemia progride, o processo de reperfusão é responsável por dois

terços do total de tecido lesado. Com o passar do tempo, o componente isquêmico é tão importante que causa inviabilidade tecidual. Consideramos que a isquemia de 60 minutos seria intensa o suficiente para provocar lesão detectável aos métodos de avaliação utilizados sem causar lesões e instabilidade irreversíveis, incompatíveis com a sobrevivência do animal. Este período é compatível com tempos de isquemia encontrados na prática clínica.

Utilizou-se o contraste Definity®, constituído de gás perfluoropropano e membrana estabilizante de fosfolípidios, adequado para avaliação do parênquima hepático. O diâmetro médio das partículas de microesferas, neste contraste, varia de 1,1 µm a 3,3 µm, sendo 98% das partículas menores que 10,0 µm e o diâmetro máximo de 20,0 µm. Após ativação do conteúdo no Vialmix®, cada mililitro da suspensão contém, no máximo,  $1,2 \times 10^{10}$  microesferas lipídicas de perfluoropropano e, aproximadamente 150 µl/mL (1,1mg/mL) de perfluoropropano. Estas propriedades se encaixam na característica principal do contraste ultrassonográfico, que é ser estritamente intra-vascular, devido ao grande diâmetro médio das micro-bolhas (2-3 µm). Não se difundindo para o parênquima, as micro-bolhas permitem avaliação confiável da microcirculação hepática (Brannigan et al., 2004).

As técnicas de ultra-sonografia com contraste com baixo índice mecânico permitem imagem dinâmica da microcirculação hepática, com avaliação das três fases vasculares de perfusão hepática (arterial, porta e tardia). Esta definição é possível devido à dupla irrigação sanguínea do parênquima hepático: pela artéria hepática e pela veia porta (Tranquart et al., 2005). Como os vasos do parênquima estão abaixo do limite de detecção do ultra-som convencional, as imagens com contraste permitem diferenciação entre o sinal dos vasos e dos tecidos sólidos, dentro do limite de resolução do aparelho de imagem.

Devido à sua maleabilidade, em situações de alteração de perfusão, as microbolhas podem ter seu trânsito lentificado ou, até mesmo, ficar estagnadas nos capilares sanguíneos. Kono et al. (2002) especulam que, devido à complexa estrutura sinusoidal do fígado, na qual o fluxo sanguíneo é lento, em situações de alteração de perfusão, as bolhas podem ser lentificadas ou mesmo estagnadas no sistema vascular deste órgão, levando a um realce prolongado do contraste. As microbolhas, após situações de isquemia e reperfusão parecem aderir às células endoteliais ativadas e aos leucócitos (Lindner et al., 2000), o que não parece ocorrer com a célula endotelial normal (Keller et al., 1989).

Kono et al. (2002) não acreditam que a ativação de células endoteliais e a fagocitose expliquem o realce da fase tardia hepática. A população dominante de microbolhas observada em seu estudo (94,2%) continuou a se mover durante os 6 minutos de observação da fase tardia, sugerindo que não foram fagocitadas e sim, lentificadas transitoriamente dentro dos sinusóides, pelo baixo fluxo, incapaz de fazê-las progredir adiante. Este autor ressalta que, nenhuma bolha aumentou de tamanho ou ficou alojada no sinusóide e que, mesmo as bolhas que se agruparam continuaram a se mover nos sinusóides sem bloquear o fluxo ou se tornar estacionárias.

Lindner et al. (1998) demonstraram que o trânsito das células pela microcirculação é anormalmente prolongado nas regiões miocárdicas submetidas à isquemia e reperfusão. Sugerem como mecanismos, interações específicas entre endotélio e regiões em que o glicocálice foi acometido com aderência direta à matriz subendotelial exposta. Espécies reativas de oxigênio apresentam papel importante na resposta inflamatória pós reperfusão e promovem adesão de leucócitos. Esta resposta é caracterizada pela liberação local de citocinas, expressão de moléculas de adesão de leucócitos à superfície endotelial e ativação de integrinas de leucócitos. As integrinas, que são responsáveis pela adesão firme de leucócitos ao endotélio das vênulas pós capilares, também mediam a interação com proteínas desnaturadas, que formam a parede das microbolhas de alguns agentes de contraste (Granger et al., 1989). Proteínas séricas do complemento também são responsáveis pela resposta imune após isquemia e reperfusão. Entre outras funções, as proteínas do complemento promovem a fagocitose de corpos estranhos e partículas anormais aderindo à sua superfície e se aderindo aos receptores de complemento dos leucócitos. Este processo de opsonização é, em parte, responsável pela interação entre leucócitos e membrana lipossomal que reveste as microbolhas dos agentes de contraste ultra-sonográfico (Collard et al., 1997).

Em seu estudo, Lindner et al. (2000) demonstram que os leucócitos firmemente aderidos à superfície endotelial das vênulas ligam-se às microbolhas e contribuem para o tempo prolongado de trânsito na microcirculação após período de isquemia e reperfusão. As interações entre leucócitos e cápsula de albumina são mediadas por integrinas  $\beta 2$  de leucócitos, enquanto as interações entre leucócitos e cápsula lipídica são mediadas pelo complemento sérico. Este estudo demonstrou

que as microbolhas aderem preferencialmente aos leucócitos ativados via moléculas de adesão. A lentificação dos leucócitos é mediada, em grande parte, pelas integrinas que, quando ativadas, interagem com receptores de imunoglobulinas (ICAM 1, VCAM 1) e outras ligandinas de superfície endotelial (Springer, 1995). Em estudo anterior, Lindner et al. (1998) haviam demonstrado perfusão inicial (*wash-in*) normal, com taxa de clareamento (*wash-out*) retardada após lesão de isquemia e reperfusão.

Lindner et al. (2000) avaliando a microcirculação do músculo cremaster de ratos, demonstram que a adesão venular de leucócitos é muito mais intensa após isquemia e reperfusão e ativação de TNF- $\alpha$ . A extensão da retenção das microbolhas na microcirculação correlaciona-se diretamente com o número de leucócitos aderentes. Apesar de microbolhas lipídicas aniônicas e catiônicas aderirem-se aos leucócitos após ativação de TNF- $\alpha$ , apenas as microbolhas aniônicas parecem aderir após isquemia e reperfusão. O *clearance* de lipossomos, complemento dependente, varia de acordo com a carga, com lipossomos aniônicos e catiônicos ativando a via preferencial ou alternativa, respectivamente. A isquemia seguida de reperfusão ativa o complemento, preferencialmente, pela via clássica o que é consistente com a observação de adesão mais importante de microbolhas aniônicas (Collard et al., 1997). A interação entre leucócitos e microbolhas presente neste estudo sugere que a intensidade de realce do contraste pode servir para diagnosticar e quantificar o processo inflamatório em qualquer órgão acessível à ultra-sonografia.

Neste estudo, verificou-se áreas com alteração de perfusão ao ultra-som com contraste, em todos os coelhos, exceto um, pertencente ao grupo tratado com OH. Em 17 dos 22 animais, evidenciou-se áreas com padrão de perfusão irregular, em mosaico, sugerindo lentificação do fluxo dentro dos sinusóides, pelo baixo fluxo local, como demonstrado por Kono et al. (2002) ou por obstáculo ao fluxo sangüíneo, como demonstrado por Lindner et al. (2000) e Granger et al. (1989).

Em três animais do grupo controle e em um do grupo tratamento, não se constatou contraste nas áreas de lesão, ou seja, estas áreas apresentavam-se desvitalizadas e corresponderam, em dois deles, a áreas de necrose periférica à macroscopia e, em outros dois, áreas de necrose central.

Ao se quantificar a área de alteração do padrão de perfusão do contraste, em centímetros, constatou-se que o tratamento com OH reduziu estas áreas de forma

significativa, sugerindo um possível efeito benéfico da oxigenoterapia nas alterações da microcirculação. Porém, ao se dividir o padrão de perfusão em variáveis categóricas: mosaico, sem perfusão ou perfusão normal, não encontramos diferença significativa entre os grupos. Atribuímos este resultado ao fato de, após 60 minutos de isquemia, haver sempre, em maior ou menor intensidade, lesão celular, com adesão de leucócitos e distúrbio de perfusão. O papel do tratamento com OH seria, então, reduzir, atenuar e/ou limitar o tamanho destas áreas de lesão. E, devido à alta sensibilidade do exame contrastado, identificam-se áreas com alteração local, mas sem lesão celular ou parenquimatosa definida ou irreversível.

Utilizando-se o coeficiente de correlação de Spearman, também não se constatou correlação entre o tamanho das áreas hipocóicas definidas à ultra-sonografia basal e, ou, o tamanho das áreas de lesão macroscópica com as áreas de alteração de perfusão à ultra-sonografia com contraste. Novamente, podemos supor que, devido à maior sensibilidade do método, o exame contrastado pode ser capaz de definir áreas de lesão ainda reversíveis, não definidas como necrose à macroscopia ou à ultra-sonografia basal.

O papel da OH na lesão tecidual mediada por espécies reativas de oxigênio e metabolismo oxidante/ antioxidante é controverso (Monstrey et al., 1997). A exposição repetida a OH ou hiperóxia poderia aumentar a formação de peróxido de hidrogênio, mas, também, induz a produção de antioxidantes pelos tecidos (Harabin et al. 1990; Ozden et al. 2004). Entretanto, o tratamento com OH não deve se estender por mais de 90 minutos nem acima de 3 atm, sob risco de acúmulo de espécies reativas de oxigênio e toxicidade cerebral ou pulmonar pelo oxigênio (Gregory e Fridovich, 1973). Chen et al. (1998) demonstraram que o nível sérico de malondialdeído (marcador de estresse oxidativo) é reduzido e a quantidade de ATP aumentada pelo tratamento com OH na lesão de isquemia e reperfusão. O efeito protetor da OH pode ser mediado pela supressão de enzimas específicas, responsáveis pela peroxidação lipídica (Kudchodkar et al., 2000).

Ozden et al. (2004) demonstraram que o nível sérico de malondialdeído está significativamente reduzido quatro dias após hepatectomia em ratos tratados com OH. Estes autores também encontraram níveis mais elevados de glutathione e superóxido dismutase (enzimas antioxidantes) no fígado remanescente dos animais submetidos ao tratamento. Concluíram que este aumento pode representar uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo, representando efeito benéfico do

tratamento com OH. Resposta semelhante de indução de antioxidantes ou de enzimas endógenas antioxidantes foi observada por Purucker e Lutz (1992) e Shang et al. (2002).

O tratamento com OH aumenta a quantidade de oxigênio dissolvido no plasma, a proliferação fibroblástica, a síntese de colágeno, a angiogênese e a neovascularização (Cohn, 1986). Além disso, o tratamento com OH reduz a contagem de leucócitos aderidos ao endotélio e os níveis de malondialdeído e aumenta a velocidade de fluxo pós-sinusoidal nas vênulas (Chen et al., 1998). Burke et al. (1986) demonstraram redução da necrose induzida por tetracloreto de carbono após OH.

Avaliou-se também, neste estudo a necrose celular pela morfologia e coloração hematoxilina-eosina. Sabe-se que a integridade da membrana celular é essencial para a sobrevivência da célula após o dano. A lesão direta sobre as membranas celulares é um evento primário de dano imunomediado. Nessas células privadas de energia, há colapso na biossíntese de novos fosfolípidios de membrana; a depleção de fosfolípidios também resulta de sua ativação por cálcio livre e o dano à membrana é inevitável. Além disso, as proteases ativadas pelo cálcio destroem o citoesqueleto das membranas celulares por meio da desnaturação de proteínas do citoesqueleto, tornando as células susceptíveis ao estresse contrátil ou osmótico (Rosser et al., 1995).

Nos últimos anos, surgiram controvérsias quanto ao mecanismo de morte celular e lesão parenquimatosa na lesão de isquemia e reperfusão: apoptose ou necrose. Alguns autores sugerem que a maior parte da lesão se deve a alterações necróticas extensas. Outros autores demonstraram que a inibição da apoptose reduz significativamente a lesão celular e aumenta a sobrevivência de animais após período prolongado de isquemia (Scorrano e Kosmeyer, 2003; Selzner et al., 2003). Apesar de terem sido considerados por muito tempo processos diferentes, apoptose e necrose parecem dividir as mesmas vias de ativação (Ghobrial et al., 2005).

A apoptose ocorre por duas vias principais. A primeira se refere à via intrínseca (mitocondrial), é tipicamente ativada por lesão do DNA, ativação da p53, privação de fator de crescimento, distúrbios metabólicos (Yin e Ding, 2003, Malhi et al. 2006). A segunda é a via extrínseca desencadeada por meio dos receptores de morte (Malhi et al., 2006). O mais importante regulador da via intrínseca é a família de proteínas Bcl-2. (Ghobrial 2005). A família Bcl-2 inclui os membros apoptóticos

como Bak, Bax, Bad, Bid e membros anti-apoptóticos como Bcl- 2, Bcl-X1 e Bcl-W. (Reed, 1994). Seguindo o sinal de morte, as proteínas pró-apoptóticas sofrem modificações que resultam em sua ativação e translocação para a mitocôndria. (Scorrano e Kosmeyer 2003). Então, a membrana mitocondrial torna-se permeável, levando à liberação do citocromo C, que promove a ativação da caspase 9, que, por sua vez, ativa a caspase 3, até o estágio final de apoptose (Ghobrial, 2005).

Na via extrínseca, uma variedade de mediadores incluindo TNF $\alpha$ , conector Fas e conector induzido pelo fator de necrose relacionado à apoptose, primeiro se ligam ao respectivo receptor de morte, que causa oligomerização do receptor e associação com várias proteínas, incluindo as associadas com receptor Fas (Ghobrial, 2005).

É cada vez mais evidente que a magnitude e o tipo de estímulo lesivo podem determinar se a célula entrará em apoptose ou em necrose. Os estímulos lesivos graves tendem a resultar em necrose, enquanto os estímulos imunomediados de baixo grau tendem a induzir apoptose. A quantidade de ATP disponível após o dano celular parece ser fator decisivo na determinação da ocorrência de necrose ou apoptose para a morte celular. Nas condições em que há depleção importante de ATP, a via necrótica é ativada (Selzner et al., 2003; Cavalieri et al., 2002).

Neste estudo, encontrou-se necrose macroscópica de coagulação em onze coelhos, sendo sete do grupo controle e quatro do grupo tratamento. Este resultado não apresentou significância estatística, quando avaliada apenas a presença ou ausência de necrose. Porém, quando foi medida a área de necrose, constatou-se redução significativa associada ao tratamento com OH.

Podemos considerar que, após 60 minutos de clampagem e reperfusão, ocorrem estímulos lesivos importantes, que resultam em necrose macroscópica de coagulação extensa. A necrose de coagulação descreve o tecido que se apresenta firme e pálido, mantendo o contorno celular e a arquitetura apesar da morte celular. É provável que esta resposta ocorra pelo fato de as células afetadas apresentarem relativamente poucos lisossomos capazes de desencadear a desnaturação das proteínas celulares. A causa mais comum deste padrão de necrose é a oclusão do suprimento arterial do tecido (Robins et al, 1991).

Em relação à avaliação microscópica, constatou-se necrose focal, centrolobular, em 20 dos 22 coelhos, não apresentando diferença estatística entre grupo controle e OH quando categorizada em esparsa, extensa ou rara. Áreas de necrose

maciça, consideradas como áreas com necrose multifocal ou com traves entre estruturas vasculares aferentes e eferentes, foram encontradas em doze coelhos, sendo seis de cada grupo, e este resultado não apresentou correlação com o grupo de estudo a que o coelho pertencia. Estas áreas de necrose focal ou maciça não apresentaram correlação com o padrão de perfusão da microcirculação hepática ou com as bordas da lesão identificadas ao ultra-som com contraste.

Em todos os coelhos, foi constatada, à microscopia, degeneração hidrópica que foi quantificada como leve, moderada ou acentuada. Não houve diferença da gravidade desta lesão entre os grupos e não houve associação com o padrão de perfusão da microcirculação ou com a delimitação das bordas da lesão identificada ao ultra-som com contraste.

Estes resultados demonstram que a histologia confirmou necrose nas áreas consideradas necróticas à macroscopia e que não houve diferença no padrão de necrose encontrado no grupo controle ou OH.

A unidade funcional de Rappaport (1976) é composta por uma série de ácinos, cada um centralizado na tríade portal com seus ramos terminais da veia porta, artéria hepática e ducto biliar (zona um). Esses se entrelaçam, principalmente de forma perpendicular com as veias hepáticas terminais dos ácinos adjacentes. As periferias circulatórias dos ácinos, adjacentes às veias hepáticas terminais (zona três, ou centro-lobular), sofrem mais com as lesões, sejam virais, tóxicas ou hipóxicas. A necrose, em parte, estabelece-se nessa área (Sherlock e Doosley, 1997). A atribuição funcional das células da periferia circulatória dos ácinos ou centrolobular (zona três), adjacentes às veias hepáticas terminais é diferente das células da zona circulatória adjacente aos ramos terminais da artéria hepática e veia porta (zona um). O suprimento de oxigênio é uma diferença óbvia, como recebem o aporte de oxigênio posteriormente, as células da zona três são particularmente propensas à lesão hepática anóxica. As células desta zona também apresentam menores concentrações de glutathione (Sherlock e Doosley, 1997).

Na microscopia óptica, as alterações reversíveis causadas pelo aumento do tamanho das organelas apresentam-se como edema celular, palidez de citoplasma e desenvolvimento de vacúolos intra-celulares causando tumefação turva, quando pouco intensas ou degeneração hidrópica, quando ocorre tumefação progressiva do retículo endoplasmático e mitocôndrias (Sherlock e Doosley, 1997).

A intensa eosinofilia da célula morta é decorrente da perda de RNA e da coagulação de proteínas. O núcleo sofre fases de picnose, cariorrexe e cariólise, resultando em uma célula enrugada e desprovida de núcleo. As células mortas liberam proteínas que podem ser detectadas no sangue (AST, ALT, LDH).

Espécies reativas de oxigênio são moléculas que possuem um elétron ímpar na sua órbita externa. São muito instáveis, têm vida média muito curta e tentam sempre se pariar (Kehrer, 1993). Estes metabólitos altamente reativos de oxigênio são gerados constantemente em todas as células e, por serem potencialmente prejudiciais, são constantemente removidos por sistemas protetores cuja integridade depende de um suprimento adequado de nutrientes.

A lesão por isquemia e reperfusão é uma das mais importantes em relação a estas espécies reativas, já que o oxigênio é um dos únicos substratos ausentes durante o processo isquêmico. O resgate do episódio isquêmico requer a reperfusão sanguínea com reintrodução de oxigênio em excesso na circulação (Olszewer, 1995; Kehrer, 1993).

O dano direto às células, por meio de uma variedade de mecanismos, especialmente relacionados com a geração de espécies reativas de oxigênio, induz apoptose pelo aumento da permeabilidade das mitocôndrias e pela liberação de fatores pró-apoptóticos na célula, os quais, por sua vez, ativam o ramo efetor do sistema de enzimas caspases da apoptose (Bilzer e Gerber., 2000). Vários componentes celulares interdependentes são alvos primários para os estímulos lesivos: membrana celular, mitocôndrias, citoesqueleto e DNA celular. Em função desta interdependência, o dano a um sistema resulta em comprometimento secundário de outros sistemas e, em última análise, morte celular, quando o dano acumulado é observado em células submetidas à privação de oxigênio e nutrientes por insuficiência de suprimento sanguíneo (Grace, 1994).

A lesão por reperfusão deveria ser controlada quando o procedimento terapêutico fosse instituído durante a isquemia. Neste estudo, a OH foi instituída após a isquemia, e, como já discutido, era de se esperar que aumentasse a formação de espécies reativas por fornecer grande quantidade de oxigênio após a reperfusão. Porém, a avaliação da microcirculação hepática e a macroscopia nos levam a advogar os efeitos benéficos da OH como tratamento da isquemia hepática segmentar normotérmica, em coelhos.

Este estudo também abre campo para pesquisas com utilização da ultrasonografia com contraste de micro-bolhas como forma da avaliação da microcirculação e/ou perfusão sanguínea do fígado e outros órgãos.

## **7. Conclusões**

O presente trabalho nos permite concluir que a oxigenoterapia hiperbárica após isquemia hepática normotérmica seletiva e reperfusão, em coelhos:

- Reduziu a lesão da microcirculação hepática, quando avaliada pela ultrasonografia com contraste de microbolhas;
- Não modificou os níveis séricos de AST, ALT e LDH;
- Reduziu a área de lesão macroscópica;
- Não modificou o padrão de lesão histológica.

## 8. Referências Bibliográficas

Abdo EE, Cunha JEM, Deluca P, et al. Protective effect of N2-mercaptopropionylglycine on rats and dogs liver during ischemia/reperfusion process. *Arq Gastroenterol* 2003; 40:177-80.

Austen WG Jr, Kyriakides C, Favuzza J et al. Intestinal ischemia-reperfusion injury is mediated by the membrane attack complex. *Surgery* 1999; 126: 343-8.

Azoulay D, Lucidi V, Andreani P, et al. Ischemic preconditioning for major liver resection under vascular exclusion of the liver preserving the caval flow: a randomized prospective study. *J Am Coll Surg* 2006; 202: 203-11.

Bedrikow R, Golin V. Oxigenoterapia hiperbárica no doente cirúrgico. In: Rasslan S. *O doente cirúrgico na UTI*. São Paulo, Editora Ateneu, 2001; 27:493-502.

Benke PJ. Jessica in the well: ischemia and reperfusion. *JAMA* 1988; 259:1326.

Billiar TR. The delicate balance of nitric oxide and superoxide in liver pathology. *Gastroenterology* 1995; 108:603-5.

Bilzer M, Gerbes AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J hepatol* 2000; 32: 508-15.

Blomley MJK, Cooke JC, Unger EC, et al. Microbubble contrast agents: a new era in ultrasound. *BMJ* 2001; 322: 1222-5.

Boin IFSF. Atuação do WEB 2086 como inibidor da ação do fator de ativação plaquetária em ratos wistar submetidos à isquemia hepática seletiva normotérmica e reperfusão. Campinas, 1997. Tese – Doutorado-Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas.

Brannigan M, Burns PN, Wilson SR. Blood flow patterns in focal liver lesions at microbubble-enhanced US. *RadioGraphics* 2004; 24: 921-35.

Burk, RF, Reiter R, Lane JM. Hyperbaric oxygen protection against carbon tetrachlorid hepatotoxicity in the rat. *Gastroenterology* 1986; 90: 812-8.

Buerke M, Murohara T, Lefer AM. Cardioprotective effects of a C1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1995; 91:393-402.

Carlson S, Jones J, Brown M, Hess C. Prevention of hyperbaric-associated middle ear barotrauma. *Annals of Emerg Med* 1992, 21: 70-2.

Castaing D, Garden J, Bismuth H. Segmental liver resection using ultrasound-guided selective portal venous occlusion. *Ann Surg* 1989; 210: 20-3.

Cavalieri B, Perrelli MG, Mastrocola R et al. Ischemic preconditioning attenuates the oxidant-dependent mechanisms of reperfusion cell damage and death in rat liver. *Liver transpl* 2002; 8: 990-9.

Cavalieri B, Mosca M, Ramadori P et al. Neutrophil recruitment in the reperfused-injured rat liver was effectively attenuated by repertaxin, novel allosteric noncompetitive inhibitor of CXCL8 receptors: a therapeutic approach for the treatment of post-ischemic hepatic syndromes. *Int J Immunopathol Pharmacol* 2005; 18(30): 475-86.

Chan RK, Ibrahim SI, Verna N et al. Ischaemia-reperfusion is an event triggered by immune complexes and complement. *Br J Surg* 2003; 90:1470-8.

Chen, MF, Chen HM, Ueng SW, Shyr MH. Hyperbaric oxygen pretreatment attenuates hepatic reperfusion injury. *Liver* 1998; 18: 110-6.

Clavien PA, Yadav SS, Sidram D, Bentley RC. Protective effects of ischemic preconditioning for liver resection performed under inflow occlusion in humans. *Ann Surg* 2000; 232: 155-62.

Clavien PA, Selzner M, Rudiger HA et al. A prospective randomized study in 100 consecutive patients undergoing major liver resection with versus without ischemic preconditioning. *Ann Surg* 2003; 238: 843-50.

Cohn, GH. Hyperbaric oxygen therapy. Promoting healing in difficult cases. *Postgrad Med* 1986; 79: 89-92.

Collard CD, Vakeva A, Bukusoglu C et al. Reoxygenation of hypoxic human umbilical vein endothelial cells activates the classic complement pathway. *Circulation*. 1997; 96: 326–333.

Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, Strieter RM. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology*. 1996; 23: 506-14.

Collins GM, Bravo Shugarman M, Tersaki PI. Kidney preservation for transportation. Initial perfusion and 30 hours'ice storage. *Lancet* 1969; 2:1219-22.

Cosgrove D, Ultrasound contrast agents: an overview. *EJR* 2006; 60: 324-30.

Costa-Val R, Nunes TA, Oliveira e Silva RC, Souza TKP. Efeitos da oxigenoterapia hiperbárica em ratos submetidos à ligadura das veias hepáticas: avaliação da mortalidade e da histologia do fígado e baço. *Acta Cir Bras*. [periódico na Internet] 2006 Jan-Feb;21(1).

Cottart C, Do L, Blanc M, Vaubourdolle M et al. Hepatoprotective effect of endogenous nitric oxide during ischemia-reperfusion injury in rat livers. *Hepatology* 1999; 29: 809-13.

Cronstein BN, Levin RL, Belanoff J et al. Adenosine: an endogenous inhibitor of neutrophil-mediated injury to endothelial cells. *J Clin Invest* 1986; 78: 760-70.

Cutrin JC, Llesuy S, Boveris A. Primary role of Kupffer cell-hepatocyte communication in the expression of oxidative estresse in the post-ischaemic liver. *Cell Biochem. Funct* 1998; 16: 65-72.

Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, et al. A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. *FASEB J* 1999; 13: 253-61.

Davies MG, Fulton GJ, Hagem PO. Clinical biology of nitric oxide. *Br J Surgery* 1995; 82: 1598-610.

Du ZY, Hicks M, Winlaw D, et al. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat. *J Heart Lung Transplant* 1996; 15:1258-67.

Fernandez L, Heredia N, Grande L et al. Preconditionng protects liver and lung damage in rat liver transplantation: role of xanthine/xanthine oxidase. *Hepatology* 2002; 36: 562-72.

Gao W, Bentley RC, Madden JF, Clavien PA. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 1998; 27: 1652-60.

Geller DA, Di Silvio M, Nussler AK, Wang SC, Shapiro RA, Simmons RL, Billiar TR. Nitric oxide synthase expression is induced in hepatocytes in vivo during hepatic inflammation. *J Surg Res.* 1993; 55:427-32.

Ghobrial IM, Witzig TE, Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 178-94.

Glazier SS, O'Rourke DM, Guaham DI, Welsch FA. Induction of inschemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab* 1994; 14: 545-53.

González-Flecha B, Cutrin JC, Boveris A. Time course and mechanism of oxidative estresse and tissue damage in rat liver subjected to in vivo ischemia-reperfusion. *J Clin Invest* 1993; 91: 456-64.

Grace PA. Ischemia-reperfusion injury (review). *Br J Surg* 1994; 81: 637-47.

Granger DN, Benoit JN, Suzuki M, Grisham MB. Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol*. 1989; 257:G683–G688.

Gregory EM, Fridovich I. Induction of superoxide dismutase by molecular oxygen. *J Bacteriol* 1973; 114: 543-8.

Grim PS, Gottlieb LJ, Boddie A, Batson E. Hyperbaric oxygen therapy. *JAMA* 1990; 263: 2216-20.

Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaesehke H. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: Apoptosis or necrosis? *Hepatology* 2001; 33: 397-405.

Harabin AL, Brainsted JC, Flynn ET. Response of antioxidant enzyme to intermittent and continuous hyperbaric oxygen. *J Appl Physiol* 1990; 69: 328-35.

Heijen BHM, Straatsburg IH, Padilla ND et al. Inhibition of classical complement activation attenuates ischaemia and reperfusion injury in a rat model. *Clin Exp Immunol* 2005; 143: 15-23.

Hisama N, Yamaguchi Y, Ishiko T et al. Kupffer cell production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant following ischemia/reperfusion injury of rat liver. *Hepatology* 1996; 26: 1193-8.

Hong JP, Kwon H, Chung YK, Jung SH. The effect of hyperbaric oxygen on ischemia-reperfusion injury: an experimental study in a rat musculocutaneous flap. *Ann Plast Surg*. 2003; 51: 478-87.

Hordnes C, Tysseboth J. Effect of high ambient pressure and oxygen tension on organ blood flow in conscious trained rats. *Undersea Biomed Res.* 1985; 12: 115-8.

Hotter G, Closa D, Prados M et al. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 222: 27-32.

Howell JG, Zibari GB, Brown MF et al. Both ischemic and pharmacological preconditioning decrease hepatic leukocyte/endothelial cell interactions. *Transplantation* 2000; 69: 300-14.

Huang PL. Endothelial nitric oxide synthase and endothelial dysfunction. *Curr Hypertens Rep* 2003; 5: 473-80.

Huguet C, Nordlinger B, Galopin JJ et al. Normothermic hepatic vascular exclusion for extensive hepatectomy. *Surg Gynecol Obst* 1978; 147: 689-93.

Isozaki H, Adam R, Gigou M et al. Experimental study of the protective effect of intermittent hepatic pedicle clamping in the rat. *Br J Surg* 1992; 79: 310-8.

Jaeschke H. Cellular adhesion molecules: regulation and functional significance in the pathogenesis of liver diseases. *Am J Physiol* 1997; 273: G602-G611.

Jassem W, Fuggle SV, Cerundolo L et al. Ischemic preconditioning of cadaver donor livers protects allografts following transplantation. *Transplantation* 2006; 81:169-74.

Kaelin CM, Im MJ, Myers RAM, Manson PN, Hoopes JE. The effects of hyperbaric oxygen on free flaps in rats. *Arch Surg* 1990; 125: 607-9.

Kanoria S, Glantzounis G, Jalan R et al. A model to study total hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transplantation Proceedings* 2004; 36: 2586-9.

Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993; 23: 21-48.

Keller NW, Segal SS, Kaul S, et al. The behavior of sonicated albumin microbubbles within the microcirculation: a basis for their use during myocardial contrast echocardiography. *Circ Res* 1989; 65: 458–467.

Kihara K, Ueno S, Skoda M, Aikou T. Effects of hyperbaric oxygen exposure on experimental hepatic ischemia reperfusion injury: relationship between its timing and neutrophil sequestration. *Liver transplantation* 2005; 11: 1574-80.

Kobayashi S, Clemens MG. Kupffer cell exacerbation of hepatocyte hypoxia/reoxygenation injury. *Circ Shock* 1992; 37: 245-52.

Kono Y, Steinbach GC, Peterson T et al. Mechanism of parenchymal enhancement of the liver with a microbubble-based US contrast medium: an intravital microscopy study in rats. *Radiology* 2002; 224: 253–7.

Kudchodkar BJ, Wilson J, Lacko a, Dory L. Hyperbaric oxygen reduces the progression and accelerates the regression of atherosclerosis in rabbits. *Arteriosclerosis, Thromb, Vasc Biol* 2000; 20: 1637-50.

Kohali V, Selzner M, Madden JF et al. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation* 1999; 67: 1099-105.

Kolski JM, Mazolewski PJ, Stephenson LL et al. Effect if hyperbaric oxygen therapy on testicular ischemia-reperfusion injury. *The Journal of Urology* 1998; 160: 601-3.

Launois B, Jamieson GG. The importance of Glisson's capsule and its sheaths in the intrahepatic approach to resection of the liver. *Surg Gyn Obst* 1992; 174: 7-10.

Leach RM, Rees PJ and Wilmskrust P. ABC of oxygen: hyperbaric oxygen therapy. *BMJ* 1998; 317: 1140-3.

Lentsch AB, Yoshidone H, Cheadle WG et al. Chemokine involvement in hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: roles for macrophage inflammatory protein-2 and Kupffer cells. *Hepatology* 1998; 27: 1172-77.

Li XK, Matin AF, Suzuki H, Uno T, Yamaguchi T, Harada Y. Effect of protease inhibitor on ischemia/reperfusion injury of the rat liver. *Transplantation*. 1993; 56: 1331-6.

Lima CX. Efeitos do pré-condicionamento por oxigenoterapia hiperbárica na lesão de isquemia e reperfusão hepática em ratos. Belo Horizonte, 2006. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais.

Lindner JR, Ismail S, Spotnitz WD et al. Albumin microbubble persistence during myocardial contrast echocardiography is associated with microvascular endothelial glycocalyx damage. *Circulation* 1998; 98: 2187–2194.

Lindner JR, Coggins MP, Kaul S et al. Microbubble persistence in the microcirculation during ischemia/reperfusion and inflammation is caused by integrin- and complement-mediated adherence to activated leukocytes. *Circulation* 2000; 101: 668-675.

Liu W, Zhao W, Lu X et al. Clinical pathological study of treatment of chronic hepatitis with hyperbaric oxygenation. *Chin Med J* 2002; 115 : 1153-7

Lloris-Carsí JM, Cejalvo D, Toledo-Pereyra LH et al. Preconditioning: effect upon lesion modulation in warm liver ischemia. *Transp Proc* 1993; 25: 3303-4.

Makuuchi M, Moim T, Guven P et al. Safety of hemi-hepatic vascular occlusion during resection of the liver. *Surg. Gynecol Obstet* 1987; 164: 155-8.

Malhi H, Gores GJ, Lemasters JJ. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? *Hepatology* 2006; 43: S 31-44.

Marcondes, CM, Lima EB. A oxigenoterapia hiperbárica como tratamento complementar das úlceras de membros inferiores – parte 1. *Ver Angiol.Cir Vasc* 2003;12: 54-60.

Marotto ME, Thurman RG, Lemasters JJ. Early midzonal cell death during low-flow hypoxia in the isolated perfused rat liver: protection by allopurinol. *Hepatology* 1988; 8: 585-90.

Marubayashi S, Oshiro Y, Maeda T et al. Protective effect of monoclonal antibodies to adhesion molecules on rat liver ischemia- reperfusion injury. *Surgery* 1997; 122: 45-52.

Matsui A. Hypertransaminasemia: the end of a thread. *J Gastroenterol.* 2005; 40:859-60.

Matsumoto K, Honda K, Kobayashi N. Protective effect of heat preconditioning of rat liver graft resulting in improved transplant survival. *Transplantation* 2001; 71: 862-8.

Mazariegos GV, O'Took K, Mielos LA et al. Hyperbaric oxygen therapy for hepatic artery thrombosis after liver transplantation in children. *Liver Transpl Surg* 1999; 5: 429-36.

Miranda LEC, Viaro F, Ceneviva T e Evora PRB. As bases experimentais da lesão de isquemia e reperfusão do fígado. Revisão. *Acta Cir Bras* 2004; 19: 3-12.

Monstrey SJ, Mullick P, Narayanan K, Ramasastry SS. Hyperbaric oxygen therapy and free radical production: an experimental study in doxorubicin (Adriamycin) extravasation injury. *Ann Plast Surg* 1997; 38: 163-8.

Nagendra AR, Mickelson JK, Smith CW. CD18 integrin and CD54-dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated human hepatocytes. *Am J Physiol* 1997; 272: G408-G416.

Nazyrov FG, Akilov KA, Ibadov RA et al. Some pathogenetic aspects of developing liver failure and preventing it in patients with liver cirrhosis after portosystemic shunting. *Vestn Khir Im I I Grek* 2002; 161: 87-90 (abstract).

Noak K, Bronk SF, Kato A, Gores GJ. Bile duct cells are more vulnerable to reoxygenation injury than to anoxia. *Transplantation* 1992; 53: 957-78.

Nylander G, Lewis D, Nordstöm H, Larsson J. Reduction of postischemic edema with hyperbaric oxygen. *Plast Reconstr Surg*. 1985; 76: 596-601.

Ozden TA, Uzun H, Bohloli M et al. The effects of hyperbaric oxygen treatment on oxidant and antioxidants levels during liver regeneration in rats. *Tohoku J Exp Med* 2004; 203:253-65 (abstract).

Olszewer E. *Radicais livres em medicina*. 2ª edição. Fundo Editorial BYK.1995. São Paulo. Pág 19-116.

Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327:524-6

Pang CY, Yang RZ, Zhong A et al. Acute ischemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 782-8.

Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986; 250: G749-53.

Peralta C, Hotter G, Closa D et al. Protective effect of preconditioning on the injury associated to hepatic ischemia-reperfusion: role of nitric oxide and adenosine. *Hepatology* 1997; 25: 934-7.

Peralta C Hotter G, Closa D et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology* 1999; 29: 126-32.

Peralta C, Bartrons R, Serafin A, et al. Adenosine monophosphate-activated protein kinase mediates the protective effects of ischemic preconditioning on hepatic ischemia-reperfusion injury in the rat. *Hepatology* 2001; 34: 1164-73.

Ping A, Chun ZX, Xue XY. Bradykinin preconditioning induces protective effects against focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res* 2005; 1059: 105-12.

Ponikvar R, Buturovic J, Cizman M et al. Hyperbaric oxygenation, plasma exchange and hemodialysis for treatment of acute liver failure in a 3-years-old child. *Artif Organs* 1998;22: 952-7.

Pringle JH. Notes on the arrest of hepatic hemorrhage due to trauma. *Ann Surg* 1908; 48: 541-9.

Purucker E, Lutz J. Effect of hyperbaric oxygen treatment and perfluorochemical administration on glutathione status of the lung. *Adv Exp Med Biol* 1992; 317: 131-6.

Quirenze CJr. Efeito do pré-condicionamento isquêmico nas fases precoce e intermediária da lesão de isquemia e reperfusão hepática em ratos. São Paulo, 2002. Tese de doutorado. Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo.

Rappaport AM. The microcirculatory acinar concept of normal and pathological hepatic structure. *Beitr. Path* 1976; 157: 215-8.

Ratych RE, Bulkley GB. Free-radical-mediated postischemic reperfusion injury in the kidney. *J Free Radic Biol Med.* 1986; 2: 311-9.

Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 1994; 124:1-6.

Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Patologia estrutural e funcional*. 4ª. Edição. 1991. Editora Guanabara Koogan S.A. Pág. 14, 77, 492.

Rockey DC, Chung JJ. Inducible nitric oxide synthase in rat hepatic lipocytes and the effect of nitric oxide on lipocyte contractility. *J Clin Invest* 1995; 95:1199-206.

Rodrigues Jr M, Marra AR. Quando indicar a oxigenoterapia hiperbárica? *Ver Assoc Med Bras* 2004; 50:240.

Roth S, Li B, Rosenbaum PS, Gupta H et al. Preconditioning provides complete protection against retinal ischemic injury in rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998; 39: 777-85.

Rosser BG, Gores GJ. Liver cell necrosis: cellular mechanisms and clinical implications. *Gastroenterology* 1995; 108: 252-78.

Rudiger HA, Clavien PA. Tumor necrosis factor-alpha, but not Fas, mediates hepatocellular apoptosis in the murine ischemic liver. *Gastroenterology* 2002; 122: 202-10.

Rudiger HA, Kang KJ, Sindram D et al. Comparison of ischemic preconditioning, intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg* 2002; 235: 400-7

Sakurai M, Hayashi R, Abe K et al. Enhancement of heat shock protein expression after transient ischemia in the preconditioned spinal cord of rabbits. *J Vasc Surg* 1998; 27: 720-5.

Sasaki H, Matsuno T, Tanaka N, Orita K. Activation of apoptosis during the reperfusion phase after rat liver ischemia. *Transplant Proceed* 1996; 28: 1908-9.

Schaper J, Schaper W. Reperfusion of ischemic myocardium: ultrastructural and histochemical aspects. *J Am Coll Cardiol* 1983; 1: 1037-46.

Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic BCL-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304: 437-44.

Selzner N, Rudiger N, Graf R and Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology* 2003; 125: 917-36.

Sessa WC, Harrison JK, Luthin O et al. Genomic analysis and expression patterns reveal distinct genes for endothelial and brain nitric oxide synthase. *Hypertension* 1993; 21: 934-8.

Shang F, Gong X, Egtesadi S et al. Vitamin C prevent hyperbaric oxygen-induced growth retardation and lipid peroxidation and attenuates the oxidation-induced up-regulation of glutathione in guinea pigs. *J Nutr biochem* 2002; 3: 307-13.

Sherlock S, Doosley J. *Diseases of the liver & biliary system*. 10<sup>th</sup> edition. 1997. pág 1-15.

Shigeki A, Masayuki I. Physiological role of sinusoidal endothelial cells and Kupffer cells and their implication in the pathogenesis of liver injury. *J. Hepatobiliary Pancreat Surg* 2000; 7: 40-8.

Shimamura Y, Guven P, Takenaka Y et al. Selective portal branch occlusion by balloon catheter during liver resection. *Surgery* 1986; 100: 938-41.

Springer T. Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte migration. *Annu Rev Physiol*. 1995; 57: 822– 7.

Takayama R, Auerswald A, Schafers HJ et al. The protective effect of superoxide dismutase during reperfusion of the ischemic lung. *Transplant Proc* 1987; 19: 1332-3.

Terajima H, Thiaener A, Hammer C, Messmer K, Yamamoto Y, Yamaoka Y. Attenuation of hepatic microcirculatory failure during in situ xenogeneic rat liver perfusion by heat shock preconditioning. *Transplant Proc*. 2000; 32:1111.

Thorsen E, Aanderud L, Aasen TB. Effects of a standard hyperbaric oxygen treatment protocol on pulmonary function. *Eur Respir J* 1998; 12: 1442-5.

Tranquart F, Claudon M e Correas JM. Recommandations pour l'utilisation des agents de contraste ultrasonores. *J Radiol* 2005; 86 :1047-54.

Turman MA, Bater CM. Susceptibility of human proximal tubular cells to hypoxia: effect of hypoxic preconditioning and comparison to glomerular cells. *Res Fail* 1977; 19: 47-60.

Uematsu D, Greenberg JH, Reivich M, Hickey WF. Direct evidence for calcium-induced ischemic and reperfusion injury. *Ann Neurol*. 1989; 26: 280-3.

Weiser MR, Williams JP, Moore FD Jr et al. Reperfusion injury of ischemic skeletal muscle is mediated by natural antibody and complement. *J Exp Med* 1996; 183: 2343-48.

Williams JP, Pechet TT, Weiser MR, Reid R, Kobzik L, Moore FD Jr. Intestinal reperfusion injury is mediated by IgM and complement. *J Appl Physiol* 1999; 86: 938-42.

Yadav SS, Howell DN, Steeber DA et al. P-Selectin mediates reperfusion injury through neutrophil and platelet sequestration in the warm ischemic mouse liver. *Hepatology* 1999; 29:1494-502.

Yamada T, Taguchi T, Hirat Y et al. The protective effect of hyperbaric oxygenation on the small intestine in ischemia-reperfusion injury. *Journal of Pediatric Surgery* 1995;6:786-90

Yin XM, Ding WX. Death receptor activation-induced hepatocyte apoptosis and liver injury. *Curr Mol Med* 2003; 3(6): 491-508

Yu SY, Chiu JH, Yang SD et al. Preconditioned hyperbaric oxygenation protects the liver against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Surg Res* 2005, 128:28-35.

Zamboni WA, Roth AC, Russell RC, Graham B, Suchy H, Kucan JO. Morphologic analysis of the microcirculation during reperfusion of ischemic skeletal muscle and the effect of hyperbaric oxygen. *Plast Reconstr Surg*. 1993; 91: 1110-23.

ANEXO 1



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

**CERTIFICADO**

Certificamos que o **Protocolo nº 60/2007**, relativo ao projeto intitulado "**Efeitos da oxigenioterapia hiperbárica concomitante à isquemia hepática normotérmica seletiva em coelhos**", que tem como responsável **Marcelo Dias Sanches**, está 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 **8/ 08/2007**.

Este certificado expira-se em **8/ 08 / 2012**.

**CERTIFICATE**

We hereby certify that the **Protocol nº 60/2007**, related to the project entitled "**Effects of hyperbaric oxygen therapy during left hepatic lobar ischemia**", under the supervision of **Marcelo Dias Sanches**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **August 8, 2007**.

This certificate expires in **August 8, 2012**.

Belo Horizonte, 24 de Setembro de 2007.

**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
Coordenador 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 – Fax: (31) 3499-4516  
[www.ufmg.br/bioetica/cetea](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea) - [cetea@pq.ufmg.br](mailto:cetea@pq.ufmg.br)

## ANEXO 2

Análise do peso e dos exames bioquímicos nos diferentes tempos de medida, nos coelhos dos dois grupos

TABELA 1  
Análise descritiva do peso (n=22)

	n	Média	Moda	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil		
							25	50	75
Peso (g)	22	2.748,18	2.900,00	284,31	2.300,00	3.400,00	2.500,00	2.780,00	2962,50

TABELA 2  
Análise descritiva dos exames bioquímicos (n=22)

	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil		
						25	50	75
AST B (UI/L)	22	17,95	6,15	8,00	30,00	13,00	17,00	22,50
AST R (UI/L)	22	251,64	254,81	15,00	1.098,00	71,75	150,50	403,75
AST T (UI/L)	22	403,68	659,84	43,00	3.024,00	113,25	158,50	447,25
ALT B (UI/L)	22	17,45	19,67	1,00	73,00	2,00	10,00	30,50
ALT R (UI/L)	22	17,41	22,79	1,00	80,00	1,00	7,00	23,00
ALT T (UI/L)	22	125,05	139,56	11,0	500,00	24,00	69,50	190,00
LDH B (UI/L)	22	408,97	216,14	116,90	928,90	257,73	372,10	471,38
LDH R (UI/L)	22	938,88	699,86	121,00	2.587,20	379,65	811,65	1.425,93
LDH T (UI/L)	22	2.410,85	2.132,21	540,20	10.304,00	1.326,33	1.735,80	2.574,40

AST= aspartato-aminotransferase; ALT= alanina-aminotransferase; LDH= desidrogenase láctica; B= basal; R= reperfusão; T= tardio.

TABELA 3

Comparação entre os resultados dos exames bioquímicos por tempo

	P-valor
AST R - AST B	.000
AST T - AST B	.000
AST T - AST R	.291
ALT R - ALT B	.904
ALT T - ALT B	.000
ALT T - ALT R	.000
LDH R - LDH B	.002
LDH T - LDH B	.000
LDH T - LDH R	.000

Teste Wilcoxon

TABELA 4

Freqüência de necrose macroscópica em lobo maior do fígado, por grupo de estudo  
(n=22)

Presença de necrose em lobo maior do fígado	Grupo		Total
	Controle	OH	
	n (%)	n (%)	
Não	4 (30,8%)	9 (69,2%)	13 (100,0%)
Sim	6 (66,7%)	3 (33,3%)	9 (100,0%)
Total	10 (45,5%)	12 (55,5%)	22(100,0%)

Valor de p= 0,192 (Teste exato de Fisher)

TABELA 5

Freqüência de necrose macroscópica em lobo médio do fígado, por grupo de estudo  
(n=22)

Presença de necrose em lobo médio do fígado	Grupo		Total
	Controle	OH	
	n (%)	n (%)	
Não	4 (28,6%)	10 (71,4%)	14 (100,0%)
Sim	6 (75,0%)	2 (25,0%)	8 (100,0%)
Total	10 (45,5%)	12 (55,5%)	22(100,0%)

Valor de p= 0,074 (Teste exato de Fisher)

TABELA 6

Comparação entre o padrão das bordas das lesões medidas pelo ultra-som contrastado e a presença de necrose maciça (n=22)

Bordas das áreas de lesão no ultra-som contrastado		Necrose maciça			
		Ausente	Esparsa	Extensa	Total
Bem delimitada	n	1	2	4	7
	% por bordas das áreas de lesão	14,3 %	28,6%	57,1 %	100,0%
	% por necrose maciça	10,0 %	50,0%	50,0%	31,8 %
Mal delimitada	n	9	2	2	14
	% por bordas das áreas de lesão	64,3 %	14,3 %	21,4 %	100,0%
	% por necrose maciça	90,0 %	50,0 %	37,5 %	63,6 %
Ausência de áreas de lesão	n	0	0	1	1
	% por bordas das áreas de lesão	0,0 %	0,0 %	100,0 %	100,0%
	% por necrose maciça	0,0 %	0,0%	12,5 %	4,5 %
Total	n	10	4	8	22
	% por bordas das áreas de lesão	45,5 %	18,2 %	36,4%	100,0%
	% por necrose maciça	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Valor p = 0,069 (Teste exato de Fisher)

TABELA 7

Comparação entre padrão das bordas das áreas de lesão medidas pelo ultra-som contrastado e presença de necrose focal (n=22)

Bordas das áreas de lesão no ultra-som contrastado		Necrose focal				
		Ausente	Esparsa	Extensa	Rara	Total
Bem delimitada	n	0	5	2	0	7
	% por bordas das áreas de lesão	0,0 %	71,4 %	28,6%	0,0 %	100,0%
	% por necrose focal	0,0 %	35,7 %	40,0%	0,0%	31,8 %
Mal delimitada	n	2	8	3	1	14
	% por bordas das áreas de lesão	14,3 %	57,1 %	21,4 %	7,1 %	100,0%
	% por necrose focal	100,0 %	57,1 %	60,0 %	100,0 %	63,6 %
Ausência de áreas de lesão	n	0	1	0	0	1
	% por bordas das áreas de lesão	0,0 %	100,0 %	0,0 %	0,0 %	100,0%
	% por necrose focal	0,0 %	7,1 %	0,0%	0,0 %	4,5 %
Total	n	2	14	5	1	22
	% por bordas das áreas de lesão	9,1 %	63,3 %	22,7 %	4,5 %	100,0%
	% por necrose focal	100,0 %	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Valor p = 0,920 (Teste exato de Fisher)

TABELA 8

Comparação entre o padrão das bordas das lesões medidas pelo ultra-som contrastado e a presença de degeneração hidrópica (n=22)

Bordas das áreas de lesão no ultra-som contrastado		Degeneração hidrópica			
		Acentuada	Leve	Moderada	Total
Bem delimitada	N	2	4	1	7
	% por bordas das áreas de lesão	28,6 %	57,1%	14,3 %	100,0%
	% por degeneração hidrópica	33,3 %	28,6 %	50,0%	31,8 %
Mal delimitada	N	4	9	1	14
	% por bordas das áreas de lesão	28,6 %	64,3 %	7,1 %	100,0%
	% por degeneração hidrópica	66,7 %	64,3 %	50,0 %	63,6 %
Ausência de áreas de lesão	N	0	1	0	1
	% por bordas das áreas de lesão	0,0 %	100,0 %	0,0 %	100,0%
	% por degeneração hidrópica	0,0 %	7,1 %	0,0 %	4,5 %
Total	N	6	14	2	22
	% por bordas das áreas de lesão	27,3 %	63,6 %	9,1 %	100,0%
	% por degeneração hidrópica	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

valor p = 0,069 (Teste exato de Fisher)