

ANDRÉ LUIS RAMIRES SEABRA

**LESÃO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO APÓS  
CLAMPAGEM CONTÍNUA OU INTERMITENTE DO  
PEDÍCULO HEPÁTICO NO COELHO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Faculdade de Medicina  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte, Minas Gerais

2008

ANDRÉ LUIS RAMIRES SEABRA

# **LESÃO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO APÓS CLAMPAGEM CONTÍNUA OU INTERMITENTE DO PEDÍCULO HEPÁTICO NO COELHO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Cirurgia.

Linha de Pesquisa  
Estudos clínicos e experimentais da cirurgia hepática e da hipertensão porta

Orientador  
Prof. Dr. Paulo Roberto Savassi Rocha

Co-orientador  
Prof. Dr. Agnaldo Soares Lima

Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2008

Seabra, André Luis Ramires.

S4381 Lesão de isquemia-reperfusão após clampagem contínua ou intermitente do pedículo hepático no coelho [manuscrito]. / André Luis Ramires Seabra. -- Belo Horizonte: 2009.

106f.: il.

Orientador: Paulo Roberto Savassi Rocha.

Co-orientador: Agnaldo Soares Lima.

Área de concentração: Cirurgia.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Traumatismo por Reperfusão. 2. Isquemia/cirurgia. 3. Hepatectomia. 4. Fígado/cirurgia. 5. Dissertações acadêmicas. I. Rocha, Paulo Roberto Savassi. II. Lima, Agnaldo Soares. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título

NLM: WI 770

# **LESÃO DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO APÓS CLAMPAGEM CONTÍNUA OU INTERMITENTE DO PEDÍCULO HEPÁTICO NO COELHO**

ANDRÉ LUIS RAMIRES SEABRA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do  
Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de  
Minas Gerais, em 02 de fevereiro de 2009.

Comissão Examinadora formada pelos professores:

---

Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos

---

Prof. Dr. Paulo César Galvão do Amaral

---

Prof. Dr. Agnaldo Soares Lima  
Co-orientador

---

Prof. Dr. Paulo Roberto Savassi Rocha  
Orientador

Belo Horizonte – Minas Gerais  
2008

Este trabalho foi realizado nos laboratórios

Laboratório de Pesquisa do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina  
da Universidade Federal de Minas Gerais

Laboratório de Apoptose do Instituto de Ciências Biológicas  
da Universidade Federal de Minas Gerais

Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Veterinário  
da Universidade Federal de Minas Gerais

Laboratório de Anatomia Patológica e Imuno-histoquímica  
da Santa Casa de Misericórdia de Maceió



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

REITOR

Prof. Dr. Ronaldo Tadêu Pena

VICE-REITORA

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Heloisa Maria Murgel Starling

PRÓ-REITOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Jaime Arturo Ramirez

PRÓ-REITOR DE PESQUISA

Prof. Dr. Carlos Alberto Pereira Tavares

FACULDADE DE MEDICINA

DIRETOR

Prof. Dr. Francisco José Penna

VICE-DIRETOR

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

COORDENADOR DE PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Carlos Faria S. Amaral

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIRURGIA

Prof. Dr. Walter Antonio Pereira

COORDENADOR DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

Prof. Dr. Edson Samesina Tatsuo

COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA:

Prof. Dr. Edson Samesina Tatsuo

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Dr. Andy Petroianu

# DEDICATÓRIA

*Eu seria feliz se um dia fosse só um pouco do que foste,  
Pois veja,*

*Lutei para escrever um documento que poderá me titular mestre;  
Tu escreveste ensinamentos na alma de toda uma comunidade.*

*Lutei para ter os confortos da vida em sociedade;  
Tu lutaste para confortar os teus, esquecendo de si mesmo.*

*Lutei, com a medicina que aprendi, para que vivesses mais;  
Tu nem precisaste lutar para confiar em mim até o fim.*

*Mas bastaria dizer que,*

*Enquanto luto para ter uma bela casa onde viver com conforto,  
**Tu construístes, duas vezes, a casa do Pai.***

***Para meu avô Nagib***

## AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por mais um passo que eu não dei sozinho;

A minha esposa **Larissa**, por todo o amor que me dedica, fortalecendo todos os meus passos, caminhando comigo e me apoiando em todos os momentos;

A meus filhos **Igor** e a **Inês**, só por existirem;

A meus pais **Marcos** e **Liane Seabra**, e meus sogros, **Carlos** e **Jary Santa Ritta**, por sua presença constante até quando morávamos a mais de dois mil quilômetros de distância;

Ao **Prof. Dr. Paulo Roberto Savassi Rocha**, pela confiança em nos receber e, decididamente, mudar nossa vida para melhor;

Ao **Prof. Dr. Agnaldo Soares Lima**, por nos proporcionar a realização do sonho da medicina do fígado e dos transplantes, e a todos os que fazem o Grupo de Transplante do IAG;

Ao **Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos**, pela receptividade tão calorosa e autêntica, que só podia acabar nessa amizade de ciência, apoptose, churrascos e solos de guitarra;

Ao **Prof. Dr. Andy Petroianu**, pela amizade e preciosos ensinamentos na experimentação animal;

Ao **Prof. Dr. André Falcão Pedrosa Costa**, pelo sólido apoio oferecido na época em que estávamos cursando a pós-graduação e pela boa amizade;

Ao **Prof. Carlos Lobo**, pelo apoio em minha trajetória profissional;

Ao **Dr. Théo Fortes**, pelo apoio a nossa estada em Belo Horizonte;

Ao **Dr. Antônio Carlos**, querido “Foguinho”, pela recepção e pelo apoio que se transformaram numa amizade cultivada com grande admiração;

Aos amigos **Guilherme Lacerda** e **Ana Luísa, Luiz Veloso** e **Gianne**, bons amigos que tornaram nossa estada em Minas Gerais tão alegre e prazerosa;

A amiga **Dr<sup>a</sup> Kelly Rodrigues**, exemplo de dedicação e compromisso, pela ajuda de todas as horas na realização desse trabalho;

Aos acadêmicos da UFMG **Fernanda Araújo** e **Guilherme Medrado**, que nos ajudaram no experimento e no cuidado com os animais;

Aos acadêmicos da UNCISAL **Nívea** e **Marcos Costa**, que nos ajudaram no experimento com morfometria digital;



Ao amigo **Mário Múcio**, que se desalojou tantas vezes para nos oferecer o conforto de sua própria casa;

Aos primos **Hermano** e **Fernanda**, pela amizade, e por mais uma casa que continuamos tendo em Belo Horizonte;

Aos amigos do curso de pós-graduação, professores e alunos, da Faculdade de Medicina, do Departamento de Cirurgia e do Instituto Alfa de Gastroenterologia, médicos, residentes, pós-graduandos e funcionários, que nos cativaram, especialmente o **Dr. Leandro Amado** e a **Sra. Rosana Cruz**;

Aos amigos da UniFígado, **Patrícia, Marta, Alexandra, Carlinhos, John** e **Paulo Sérgio**, pela confiança que permitiu unir forças para construir um projeto comum tão importante para nossa região, em especial ao amigo **Herbert Motta**, por nos ensinar “o caminho” da UFMG, e pelas oportunidades e vitórias que compartilhamos;

Ao Sr. **Pedro Robério Nogueira**, pela visão aguçada e futurista, simbolizada pela confiança com que nos sustenta em nossos projetos no Hospital do Açúcar e no Estado de Alagoas;

Aos amigos do Hospital do Açúcar, que com sua acolhida e confiança nos permitiram construir um serviço pioneiro no estado de Alagoas, em especial os colegas **Edgar Antunes** e **Teotônio Correia**;

À instituição que me permitiu chegar até aqui, em sua luta para crescer e se desenvolver sempre mais, na certeza de minha presença na construção de uma grande universidade: a **UNCISAL**.

# **AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS**

## **Fontes de fomento**

Esse trabalho foi financiado por:

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

HEJC – Hospital-Escola Dr. José Carneiro

UNCISAL – Universidade de Ciências da Saúde de Alagoas

*“Há lugares de onde se tira a prata, lugares onde o ouro é apurado; o ferro é extraído do solo, o cobre de uma pedra fundida.*

*Mas a sabedoria, de onde sai ela? Onde o jazigo da inteligência?*

*Não pode ser adquirida com ouro maciço, nem comprada a peso de prata. Não pode ser posta em balança com o ouro de Ofir, com o ônix precioso ou a safira.*

*Deus conhece o caminho para encontrá-la, é Ele quem sabe o seu lugar, porque Ele vê até os confins da terra, e enxerga o que há debaixo do céu.*

*Quando Ele se ocupava em pesar os ventos, fixava as leis da chuva, e traçava uma rota aos relâmpagos, então a viu e a descreveu, penetrou-a e escrutou-a, depois disse ao homem: ‘O temor do Senhor, eis a sabedoria; fugir do mal, eis a inteligência’.”*

**Bíblia Sagrada**  
*Jó 28, 1-2;12;15-16;23-28.*

# ÍNDICE

DEDICATÓRIA.....	6
AGRADECIMENTOS .....	7
AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS.....	9
ÍNDICE .....	11
LISTA DE TABELAS .....	14
LISTA DE FIGURAS.....	16
LISTA DE GRÁFICOS.....	19
LISTA DE ABREVIATURAS.....	20
Resumo .....	21
1 Introdução .....	23
1.1 Revisão da Literatura .....	24
1.1.1 Lesão de isquemia-reperfusão hepática.....	24
1.1.2 Clampagem do pedículo hepático .....	29
1.1.3 Apoptose.....	37
2 Objetivo .....	43
3 Material e Método.....	44
3.1 Parecer ético .....	44
3.2 Material .....	44
3.2.1 Animais de experimentação.....	44
3.2.2 Delineamento experimental .....	45
3.2.3 Processamento Histológico .....	52
3.2.4 Morfometria.....	54
3.2.4.1 Digitalização dos campos.....	54

3.2.4.2	Análise Morfométrica e Quantificação do Índice apoptótico.....	55
3.2.4.3	Determinação do número mínimo de campos representativos ..	57
3.2.4.4.	Qualificação do índice apoptótico com a reação de TUNEL .....	60
3.3	Análise estatística .....	61
4	Resultados .....	63
4.1	Adaptação dos animais .....	63
4.2	Ato cirúrgico e evolução pós-operatória .....	63
4.3	Análise bioquímica .....	63
4.3.1	Análise da distribuição.....	64
4.3.1	Análise intra-grupo.....	65
4.3.1.1	Grupo 1 (controle).....	65
4.3.1.2	Grupo 2 (isquemia contínua).....	66
4.3.1.3	Grupo 3 (isquemia intermitente).....	67
4.3.2	Análise inter-grupos.....	69
4.4	Quantificação da apoptose nos fragmentos hepáticos.....	70
4.4.1	Análise da distribuição e de médias .....	70
4.4.2	Análise intra-grupo.....	71
4.4.3	Análise inter-grupos.....	74
4.5	Achados histológicos.....	77
5	Discussão.....	79
5.1	Estado atual do assunto.....	79
5.2	Objetivos .....	80
5.3	Modelo experimental.....	81
5.4	Grupos e protocolo de pesquisa.....	82
5.5	Análise estatística e resultados.....	84

6	Conclusões .....	91
7	Referências Bibliográficas (150-153) .....	92
	ANEXOS .....	105
	ANEXO A – Certificado de aprovação do CETEA – UFMG .....	106

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coeficientes de variância obtidos para os índices apoptóticos de cada conjunto de campos estudados.....	59
Tabela 2. Estatística descritiva dos valores estáveis da curva de CV.....	60
Tabela 3. Resultado do teste K-S para verificação de normalidade nos grupos experimentais subdivididos nos três tempos do experimento. ....	64
Tabela 4. Análise dos marcadores bioquímicos no grupo controle (teste T de Student com amostras pareadas). ....	65
Tabela 5. Análise pareada dos marcadores bioquímicos no grupo isquemia contínua (teste T de Student com amostras pareadas).....	66
Tabela 6. Médias de DHL, AST e ALT no grupo isquemia contínua (valores em U/l).....	67
Tabela 7. Análise pareada dos marcadores bioquímicos no grupo isquemia intermitente.....	68
Tabela 8. Médias de FA, DHL, BT e AST no grupo isquemia intermitente.....	69
Tabela 9. Diferenças encontradas na análise inter-grupos pelo teste T independente.....	69
Tabela 10. Resultado do teste K-S para normalidade nos grupos experimentais subdivididos nos três tempos do experimento.....	70
Tabela 11. Médias dos índices apoptóticos nos grupos, de acordo com o momento do experimento (tempo). ....	71
Tabela 12. Análise pareada dos índices apoptóticos no grupo controle.....	71
Tabela 13. Análise pareada dos índices apoptóticos no grupo de isquemia contínua.....	72

Tabela 14. Análise pareada dos índices apoptóticos no grupo de isquemia intermitente.....	72
Tabela 15. Análise independente dos índices apoptóticos entre os grupos.....	75



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo para geração de radicais livres de oxigênio na lesão de isquemia-reperfusão (2). .....	26
Figura 2. Ciclo de eventos relacionando a lesão inflamatória associada à isquemia e a lesão microcirculatória (2, 17). .....	27
Figura 3. Padrões e frequências de ramificação da veia porta no hilo hepático(43). .....	31
Figura 4. Padrões de distribuição da artéria hepática no hilo hepático. À esquerda, a distribuição mais comum, presente em metade dos casos. No centro, a artéria hepática esquerda é ramo acessório. Na figura à direita, o ramo direito se origina na artéria mesentérica superior(43). .....	32
Figura 5. Drenagem venosa do fígado, em sua distribuição mais comum. As letras a,b,c e d representam os territórios de colaterais e os setores de drenagem de cada veia (40).....	33
Figura 6. Manobra de clampagem do pedículo hepático como descrito por Pringle (34, 40).....	34
Figura 7. Exclusão vascular total, onde todo o influxo hepático é suspenso, pela clampagem da tríade porta e veia cava inferior em posições supra e infra-hepática.....	35
Figura 8. Clampagem hepática parcial, onde um setor hepático (direito ou esquerdo) é submetido à isquemia, enquanto o setor contralateral permanece com fluxo sanguíneo. ....	36
Figura 9. Representação da diferença entre apoptose e necrose.....	40

Figura 10. Procedimento cirúrgico sobre os animais de experimentação: I. Laparotomia. ....	46
Figura 11. Procedimento cirúrgico sobre os animais de experimentação: II. Punção da veia cava inferior sob visão direta. ....	47
Figura 12. Biópsia hepática: 1 e 2. Fragmento de superfície (dissecção com tesoura); 3. Fragmento profundo (aspiração); 4. Kit comercial <i>Hepafix</i> ® de biópsia aspirativa e aspecto dos fragmentos obtidos pelos dois métodos.....	47
Figura 13. Mecanismo utilizado para clampagem do pedículo hepático no animal de experimentação, demonstrando a isquemia obtida (à direita). Animal de exemplo do grupo 2, animal 5. ....	51
Figura 14. Digitalização dos campos em aumento de 400x. ....	55
Figura 15. Identificação de células em apoptose em um campo digitalizado. Os dois círculos vermelhos destacam duas células em apoptose, apresentando anoiquia e condensação nuclear. Fragmento corado com hematoxilina-eosina, 400x.....	56
Figura 16. Quantificação de células em apoptose em um campo digitalizado com o software <i>Image Tool for Windows</i> ®.....	57
Figura 17. Campo digitalizado obtido a partir de lâmina submetida à reação de TUNEL, evidenciando uma figura isolada de apoptose (núcleo corado denso circulado em vermelho). TUNEL, 400x.....	61
Figura 18. Campo microscópico mostrando coloração fraca por TUNEL antes da isquemia, qualificando o resultado da contagem para obtenção do índice apoptótico (TUNEL, 400x).....	73

Figura 19. Campo microscópico obtido do mesmo animal após isquemia, com forte coloração nuclear pelo método de TUNEL, evidenciando o aumento da detecção da fragmentação do DNA (TUNEL, 400x).....	74
Figura 20. Fotomicrografia mostrando as alterações histológicas encontradas após o período de clampagem contínua (HE, 400x). .....	78

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Resultado da análise para determinação do número mínimo de campos representativos (com a curva de tendência em serrilhado na cor vermelha). .....	59
Gráfico 2. <i>Boxplot</i> com as médias dos índices apoptóticos no tempo um, para os três grupos experimentais. ....	76
Gráfico 3. <i>Boxplot</i> com as médias dos índices apoptóticos no tempo dois, para os três grupos experimentais. ....	76
Gráfico 4. <i>Boxplot</i> com as médias dos índices apoptóticos no tempo três, para os três grupos experimentais. ....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADP	Difosfato de adenosina
ALT	Alanino-aminotransferase
AMP	Monofosfato de adenosina
AST	Aspartato-aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
BT	Bilirrubina total
CV	Coeficiente de variância
DHL	Desidrogenase láctica
FA	Fosfatase alcalina
GGT	Gama glutamil-transferase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina e eosina
IA	Índice apoptótico
LIR	Lesão de isquemia e reperfusão
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
PBS	Phosphate buffered saline (tampão fosfato salino)
T1	Tempo 1
T2	Tempo 2
T3	Tempo 3
TdT	Transferase terminal de deoxinucleotídeos
TNF	Fator de necrose tumoral
TUNEL	Transferase terminal de deoxinucleotídeos Biotina-dUTP Nick End Labeling
UTP	5-Bromo-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato

## Resumo

**Introdução:** O controle das hemorragias nas hepatectomias é um desafio para o cirurgião. A clampagem do pedículo hepático é manobra cirúrgica capaz de reduzir o sangramento por meio de isquemia, mas induz sofrimento hepatocelular; em conjunto com a reperfusão no término da clampagem, ela provoca a lesão de isquemia-reperfusão (LIR). Esse estudo se propõe a estudar os efeitos da LIR sobre o fígado após clampagens contínuas e intermitentes do pedículo hepático, em modelo animal, utilizando a bioquímica sérica e parâmetros morfométricos teciduais (apoptose) para avaliação. **Método:** Foram utilizados 20 coelhos da raça *New Zealand* distribuídos nos grupos 1 (controle), 2 (60 minutos de isquemia contínua) e 3 (60 minutos de isquemia intermitente alternando 12 minutos de isquemia e 3 de reperfusão). Foram coletados sangue e biópsias hepáticas antes da isquemia, no seu término e após 6 horas de reperfusão, quando os animais eram mortos. Das amostras de sangue se obtiveram os valores de BT, FA, GGT, AST, ALT e DHL. Os fragmentos hepáticos foram submetidos à processamento histológico (parafinização e coloração HE) e histoquímico (reação de TUNEL) e digitalização de campos microscópicos para quantificação e qualificação de apoptose. **Resultados:** A isquemia provocou aumento de DHL, AST e ALT no grupo 2 e de FA, DHL, BT e AST no grupo 3 em análise pareada. Entre os grupos 2 e 3, AST e FA apresentaram alteração em análise independente (teste T de Student). A isquemia provocou aumento do índice apoptótico quantificado pelo método em ambos os grupos em relação a si mesmos e aos controles, mas não entre os grupos. Após a reperfusão os índices retornaram aos valores iniciais.

**Conclusão:** Em relação ao desenvolvimento de apoptose após clampagem contínua ou intermitente do pedículo hepático, baseando-se nos parâmetros morfométricos utilizados, não houve diferença entre os métodos.

Palavras-chave: isquemia/cirurgia; traumatismo por reperfusão;  
fígado/cirurgia; hepatectomia; apoptose.

## 1 Introdução

O controle das hemorragias nas operações sobre o fígado permanece como grande desafio para o cirurgião. As técnicas para seu controle vão desde a clampagem do pedículo hepático até a exclusão vascular total que associa a primeira à clampagem da veia cava inferior acima e abaixo do órgão.

A clampagem do pedículo hepático é manobra cirúrgica utilizada em operações sobre o fígado, tanto eletivas quanto de urgência. Seu objetivo é reduzir sangramento do parênquima hepático e permitir, ao cirurgião, a execução do procedimento sem hemorragia excessiva que poderia chegar a comprometer o êxito do procedimento e ameaçar a vida do paciente.

Um efeito adverso da clampagem do pedículo hepático é a isquemia do órgão, que em conjunto com a reperfusão que sucede o final da clampagem, pode determinar lesão conhecida como lesão de isquemia-reperfusão (LIR). Foi descrito também aumento de translocação bacteriana relacionado à clampagem (1).

A isquemia minimiza sangramento durante a cirurgia hepática. Entretanto induz diferentes intensidades de sofrimento hepatocelular. Até certo limite de difícil precisão, os pacientes irão responder melhor às lesões provocadas pela isquemia e reperfusão hepáticas do que aos danos provocados por hemorragias extensas e múltiplas transfusões de hemoderivados. A clampagem hepática intermitente, na qual períodos curtos de clampagem são intercalados com reperfusão, pode ser um meio de minimizar o dano celular no órgão ao impedir isquemia quente prolongada. (2).



Esse estudo se propõe a estudar os efeitos da LIR sobre o parênquima hepático após clampagens contínuas e intermitentes do pedículo hepático, em modelo animal, utilizando a bioquímica sérica e parâmetros morfométricos teciduais (apoptose) como instrumentos de avaliação do dano celular.

## **1.1 Revisão da Literatura**

### **1.1.1 Lesão de isquemia-reperfusão hepática**

A LIR hepática pode ser conceituada como um conjunto de distúrbios circulatórios e metabólicos que evolui com disfunção hepática e dano tissular secundários a período seqüencial de isquemia do fígado (em temperatura normal ou resfriado) seguido de sua reperfusão sanguínea (3).

A isquemia hepática ocorre em vários eventos, tais como transplante, choque hemodinâmico e hepatectomias (4-6). A LIR resulta em falência microcirculatória, seguida de necrose e morte celular (7). A proteção dos hepatócitos na LIR é importante para a cirurgia hepática (8).

A isquemia é fator determinante na fisiopatologia de entidades como infarto do miocárdio, insuficiência vascular periférica, choque hipovolêmico e insuficiência hepática. Apesar da restauração do fluxo sanguíneo ser essencial para reversão do dano, a reperfusão costuma agravar o dano celular isquêmico, de modo que as alterações histológicas induzidas por  $n$  horas de isquemia, seguidas por uma hora de reperfusão, são mais graves do que as induzidas por  $n+1$  horas de isquemia intestinal isolada (2).

Sabe-se que as conseqüências da isquemia têm relação com sua duração. Além disso, muitas das lesões ocorrem na fase de reoxigenação tecidual em conseqüência da reperfusão (9, 10).

Um dos mecanismos aceitos para compor a fisiopatologia da LIR é que, durante a isquemia, há acúmulo de hipoxantina nas células, enquanto no início da reperfusão ocorrem diminuição da NADH desidrogenase, do carreador de ADP/ATP e da ATP sintetase, aumento da fosfolipase A2 e acúmulo de cálcio nas mitocôndrias, levando à geração de radicais livres de oxigênio. O déficit energético celular leva a falha do transporte ativo trans-membrana. Com isso, ocorre tumefação endotelial e das células de Kupffer, vasoconstricção, acúmulo leucocitário e agregação plaquetária dentro dos sinusóides. Ocorre falência da microcirculação, resultante desse edema intracelular. A vasoconstricção, por sua vez, é resultado da deterioração entre o balanço de óxido nítrico e endotelina; a diminuição do lúmen sinusoidal provoca estase leucocitária, que apesar de não ocluir o fluxo sanguíneo na microcirculação hepática contribui para sua diminuição, aumentando o período de hipóxia e determinando que áreas do fígado permaneçam isquêmicas mesmo após a reperfusão. Tais fatos ativam, ainda mais, as células de Kupffer e os neutrófilos, que produzem citocinas inflamatórias e mais radicais livres de oxigênio gerando ciclo vicioso (3, 10-17). A figura 1 ilustra o mecanismo proposto para a liberação de radicais livres e para os fenômenos vasculares que ocorrem na LIR.

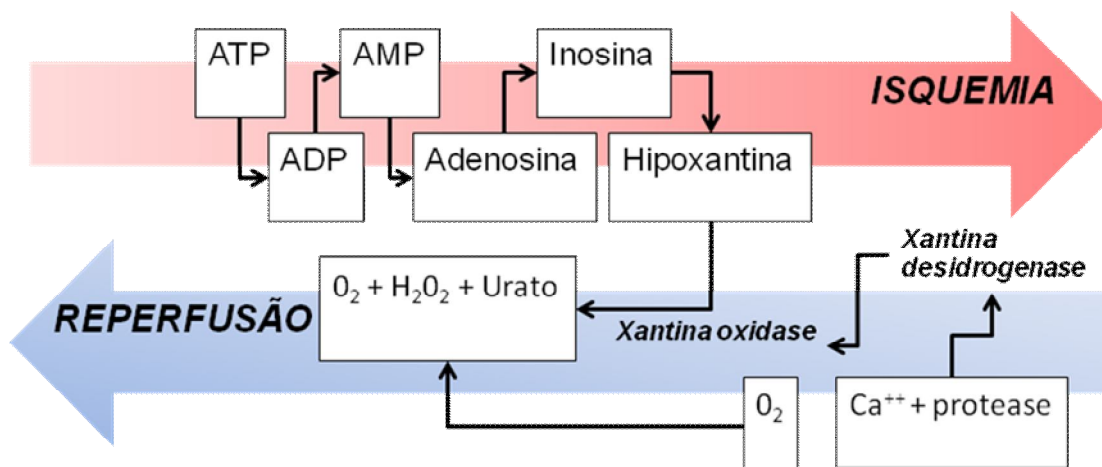


Figura 1. Mecanismo para geração de radicais livres de oxigênio na lesão de isquemia-reperfusão (2).

*ATP – trifosfato de adenosina; ADP – difosfato de adenosina; AMP – monofosfato de adenosina;  $H_2O_2$  – peróxido de hidrogênio.*

A interação entre a liberação dos radicais livres de oxigênio é quimiotática para neutrófilos e células de Kupffer, como foi descrito. A liberação de outras citocinas como leucotrienos, tromboxanos, e, principalmente, endotelinas e fator de necrose tumoral (TNF) contribui com a manutenção do ciclo da isquemia microcirculatória após a reperfusão (2, 17). As citocinas, mantendo assim a resposta inflamatória, respondem pelo componente de reperfusão da LIR (18).

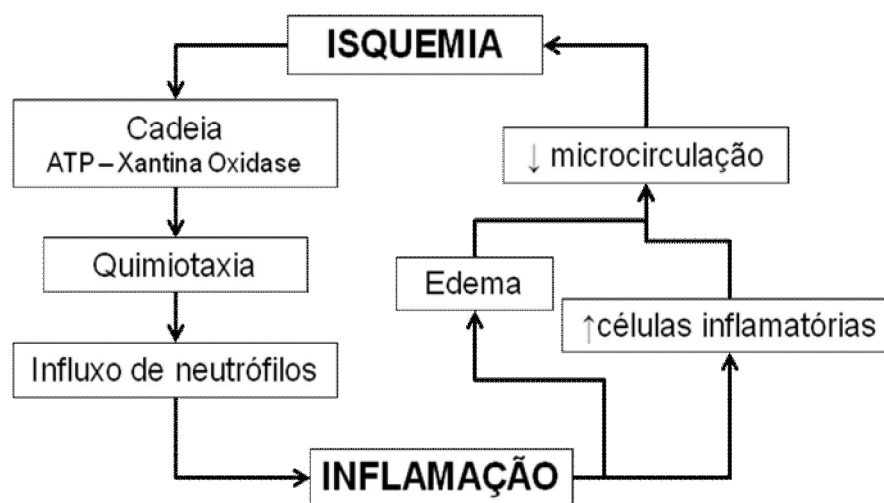


Figura 2. Ciclo de eventos relacionando a lesão inflamatória associada à isquemia e a lesão microcirculatória (2, 17).

*ATP – trifosfato de adenosina.*

A lesão celular provocada pelas isquemia e reperfusão é condicionada pelo tempo de isquemia e pelo momento da reperfusão, podendo abranger desde alterações bioquímicas até a necrose celular, passando pela apoptose (2, 19, 20).

Na isquemia hepática ocorrem diminuição do consumo de oxigênio para fosforilação mitocondrial (de ADP em ATP e produção de energia) e aumento do consumo de oxigênio para a geração e manutenção do potencial de membrana. Até determinado limite a compensação dos eventos descritos mantém a membrana estável com potencial inalterado entre animais isquemiados e controles (21). A alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial (que pode ser afetada pela presença de radicais livres de oxigênio e de  $\text{Ca}^{++}$ ) induz o intumescimento da matriz mitocondrial (*swelling*). Esses eventos aumentam a peroxidação lipídica na isquemia, produzindo aumento na produção de malondialdeído. Todas essas relações foram demonstradas por alguns autores em estudos bioquímicos e experimentais (22-26).

A reperfusão vem acompanhada de alterações do fluxo sanguíneo que têm relação com as células de Kupffer, influenciada pela endotelina (que provoca contração arteriolar) e pelo nitroprussiato de sódio (que provoca relaxamento). A partir dessa constatação, Kawada et al. (27) propuseram que a LIR pode resultar de desequilíbrio entre os níveis de endotelina e de óxido nítrico no período de reperfusão. Foram encontrados aumento dos níveis de endotelina e diminuição de fluxo sanguíneo, além de diminuição do nível de óxido nítrico ao final da isquemia, que se normalizam apenas seis horas após a reperfusão (28-30).

Em ratos *wistar* se demonstrou que com tempos mais curtos de isquemia podem não ocorrer alterações dos níveis de bilirrubinas em relação a controles; entretanto foram observadas alterações das transaminases, não após a isquemia, mas após a reperfusão (21).

A agressão hepática secundária a LIR foi estudada inicialmente por marcadores bioquímicos como as aminotransferases, enzimas canaliculares, bilirrubinas e a desidrogenase láctica (31).

Mais recentemente, a LIR hepática foi quantificada por meio das dosagens de marcadores como o malondialdeído (que avalia o grau de peroxidação da membrana lipídica do hepatócito); a mieloperoxidase (que quantifica a intensidade do infiltrado neutrofílico); e o ácido hialurônico (que se associa à lesão das células endoteliais hepáticas após a LIR). Tais marcadores, entretanto, podem ser influenciados por qualquer dano tecidual em outros órgãos (32).

Vollmar et al (3) utilizaram microscopia de fluorescência e eletrônica, além de testes bioquímicos, para caracterizar as alterações microcirculatórias e hepatocelulares na isquemia contínua em ratos, procurando associar o grau de

lesão hepatocelular com as alterações microvasculares e o tempo de isquemia. Observaram que os danos hepatocelulares estão associados com ambos.

Em modelo suíno foram comparadas as isquemias hepáticas contínua ou intermitente por duas horas, sendo o modelo intermitente com 12 minutos de isquemia e três minutos de reperfusão. A dosagem de ácido hialurônico no tecido hepático foi utilizada para estimar a lesão hepatocelular, com diferença significativa em prol da clampagem intermitente (33).

### **1.1.2 Clampagem do pedículo hepático**

A manobra de oclusão do pedículo hepático com sua tríade porta descrita por Pringle, em 1908 (34), foi inicialmente desenvolvida para reduzir o sangramento hepático durante ressecções de emergência. Em 1950, Lortat-Jacob(35) definiu os princípios de exposição e controle dos pedículos hepáticos e do influxo sanguíneo para o órgão quando relatou a primeira grande ressecção hepática regrada. Suas descobertas permitiram a queda progressiva nas morbidade e mortalidade das hepatectomias e propiciaram o aumento progressivo das grandes ressecções hepáticas, com mínima perda sanguínea, durante os últimos 50 anos. Atualmente, embora algumas ressecções já possam ser feitas sem clampagem, a perda mínima de sangue permanece como fator crucial na cirurgia hepática. Diversos estudos, nos últimos decênios, mostraram menores mortalidade e morbidade com o uso dessas manobras durante a ressecção hepática eletiva (36-40).

A exclusão vascular do fígado pode ser realizada de forma parcial ou total, com a clampagem da tríade porta ou com a associação dessa com a clampagem da veia cava em posição supra e infra-hepática (2, 40, 41).

O fígado recebe um influxo vascular duplo equivalente a cerca de um quarto do débito cardíaco (cerca de 1,5 l/min no adulto), sendo 75% provenientes da veia porta e o restante, da artéria hepática. A veia porta, originada da confluência das veias mesentérica superior e esplênica atrás e à esquerda da porção cefálica do pâncreas, divide-se em dois ramos imediatamente antes ou ao penetrar no hilo hepático.

Um ramo direito verticalizado e curto (que pode estar ausente em casos de trifurcação porta, em que os ramos setoriais anterior e posterior direito emergem da divisão troncular da veia) e um ramo esquerdo mais longo e orientado horizontalmente. Em casos raros, outras variações são possíveis (40, 42, 43) conforme descrito na figura 3.

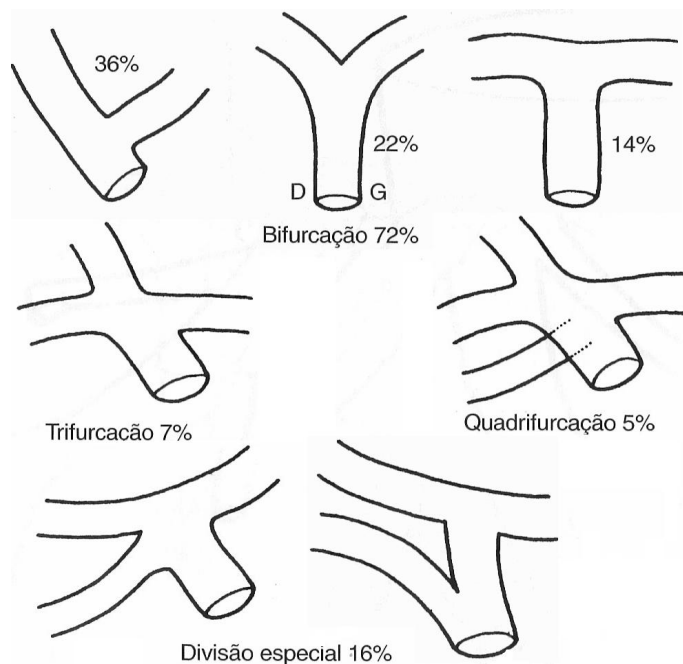


Figura 3. Padrões e frequências de ramificação da veia porta no hilo hepático(43).

A artéria hepática é classicamente descrita como um ramo do tronco celíaco que em seu trajeto origina as artérias gástrica direita e gastroduodenal, para, a seguir, penetrar no ligamento hepatoduodenal. Entretanto sua disposição anatômica é muito variável. Antes de entrar no hilo hepático, origina ramos direito e esquerdo que ficam posteriormente situados em relação aos ductos biliares, em cerca de 50% dos casos. No restante das vezes, o ramo esquerdo se origina diretamente na artéria gástrica esquerda e/ou o ramo direito origina-se na artéria mesentérica superior(42, 43), conforme reproduzido na figura 4.



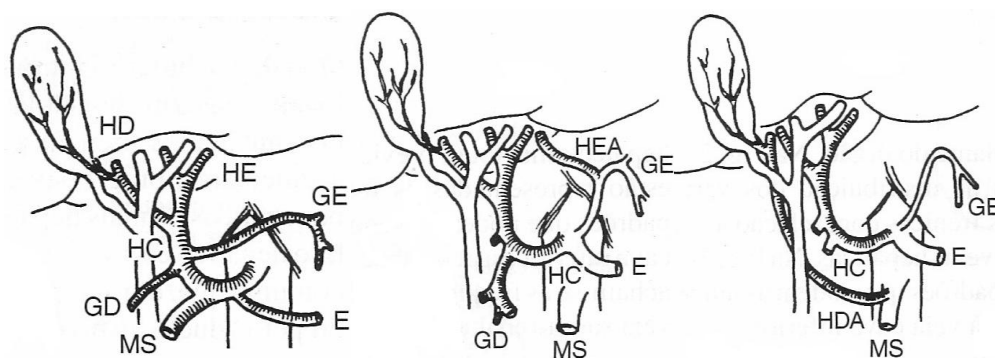


Figura 4. Padrões de distribuição da artéria hepática no hilo hepático. À esquerda, a distribuição mais comum, presente em metade dos casos. No centro, a artéria hepática esquerda é ramo acessório. Na figura à direita, o ramo direito se origina na artéria mesentérica superior(43).

*HD – artéria hepática direita; HE – artéria hepática esquerda; HC – artéria hepática comum; GD – artéria gastroduodenal; MS – artéria mesentérica superior; GE – artéria gástrica esquerda; E – artéria esplênica; HEA – artéria hepática esquerda acessória; HDA – artéria hepática direita acessória.*

A drenagem de sangue do fígado acontece pelas veias hepáticas, que drenam para a veia cava inferior. As veias hepáticas têm origem nos espaços porta a partir de vênulas centrais nos lóbulos hepáticos, que se unem gradativamente até formar três grandes veias setoriais ou sub-lobulares, que drenam o fígado por setores direito, médio e esquerdo, além de veias hepáticas dorsais que drenam diretamente para a veia cava e representam, principalmente, a drenagem do lobo caudado. As veias hepáticas média e esquerda comumente se unem em tronco único (85%) a 1 cm ou menos da confluência com a veia cava, imediatamente abaixo do hiato diafragmático. A veia hepática direita se une à veia cava pouco lateralmente ao tronco venoso hepático médio-esquerdo e é única em 95% dos casos. Essa distribuição está reproduzida na figura 5.

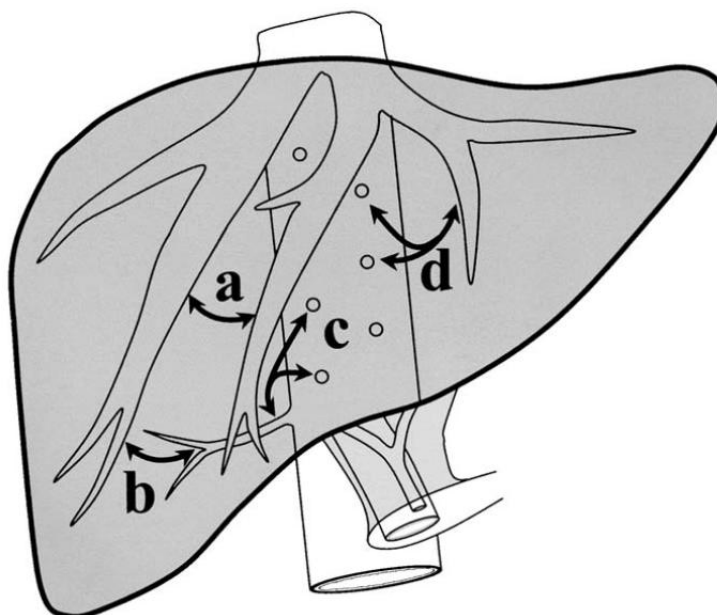


Figura 5. Drenagem venosa do fígado, em sua distribuição mais comum. As letras a,b,c e d representam os territórios de colaterais e os setores de drenagem de cada veia (40).

A técnica clássica para controle vascular compreende o reparo do ligamento hepatoduodenal com fita de tecido presa a mecanismo de torniquete (que pode ser substituído por pinça de clampagem vascular) ajustado até o desaparecimento do pulso da artéria hepática distalmente à ligadura. Deve-se observar a presença das variações anatômicas que poderão demandar clampagens adicionais (presença de artéria hepática esquerda ramo da artéria gástrica esquerda) (34, 40).

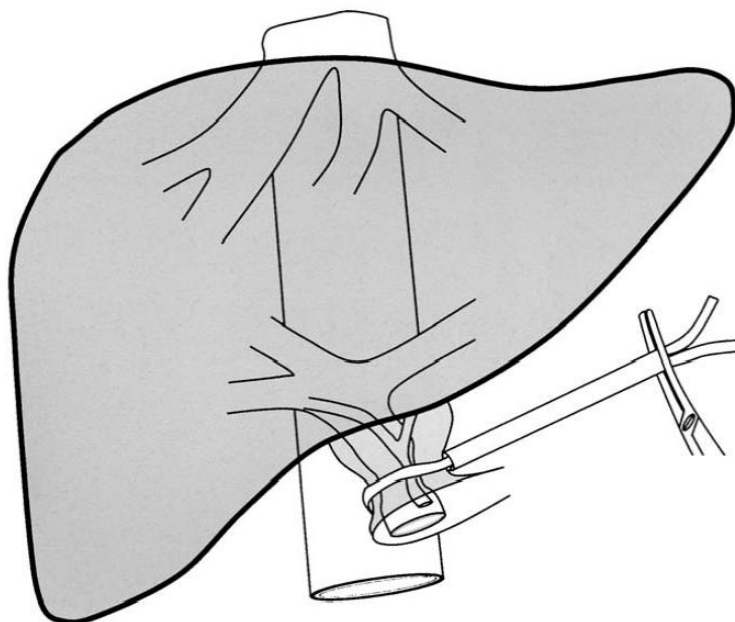


Figura 6. Manobra de clampagem do pedículo hepático como descrito por Pringle (34, 40).

Belghiti e cols. descreveram as variações hemodinâmicas e limitações da clampagem hepática: após a clampagem clássica de Pringle, observaram queda de 10% do débito cardíaco, acompanhada de aumento da resistência vascular periférica de modo a produzir aumento, de até 10%, na pressão arterial média (44).

As técnicas de clampagem hepática compreendem, além da manobra de Pringle contínua, a clampagem intermitente da tríade porta, a clampagem hepática parcial, a exclusão vascular total, o pré-condicionamento isquêmico e a clampagem da tríade porta associada à da veia cava inferior (40, 41, 45).

As modificações técnicas introduzidas visaram, ao longo do tempo, resolver problemas técnicos ou minimizar a LIR. O refluxo sanguíneo pelas veias hepáticas, que ocorre quando a pressão venosa central não é adequadamente controlada, pode ser minimizado pela exclusão vascular total, ou, ainda, pela

clampagem da veia cava acima das renais e abaixo do fígado. Para permitir operações mais prolongadas, foi proposta a clampagem intermitente, onde períodos de reperfusão são intercalados com períodos de isquemia visando, assim, prolongar o tempo cirúrgico, porém com aumento no volume de sangramento trans-operatório. A clampagem hepática parcial foi proposta para operações periféricas ou superficiais onde não fosse necessária a interrupção do fluxo sanguíneo para todo o fígado. O pré-condicionamento isquêmico tem por princípio conseguir maior tolerância à isquemia por um órgão quando se submete o mesmo a um período curto de isquemia e reperfusão antes do período de isquemia principal (36, 40, 41, 46-52). Esses métodos para clampagem hepática estão demonstrados nas figuras 7 e 8.

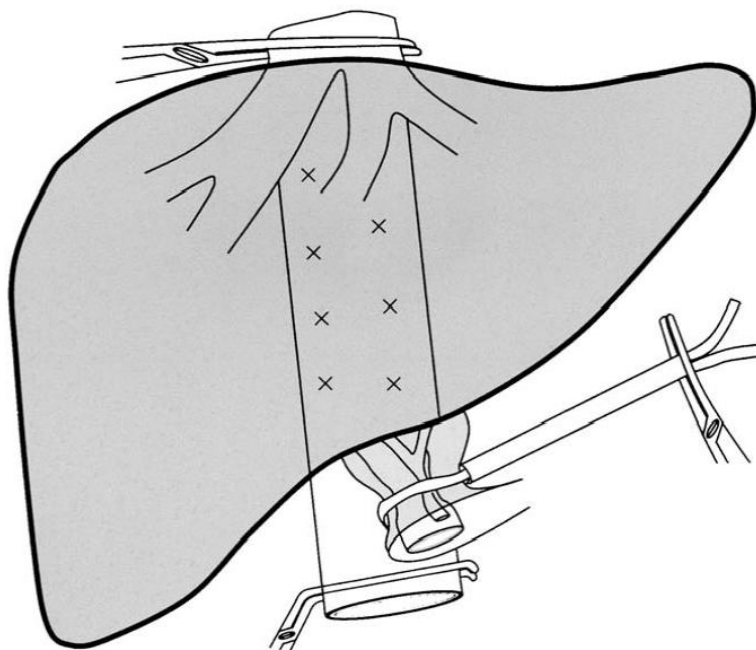


Figura 7. Exclusão vascular total, onde todo o influxo hepático é suspenso, pela clampagem da tríade porta e veia cava inferior em posições supra e infra-hepática.

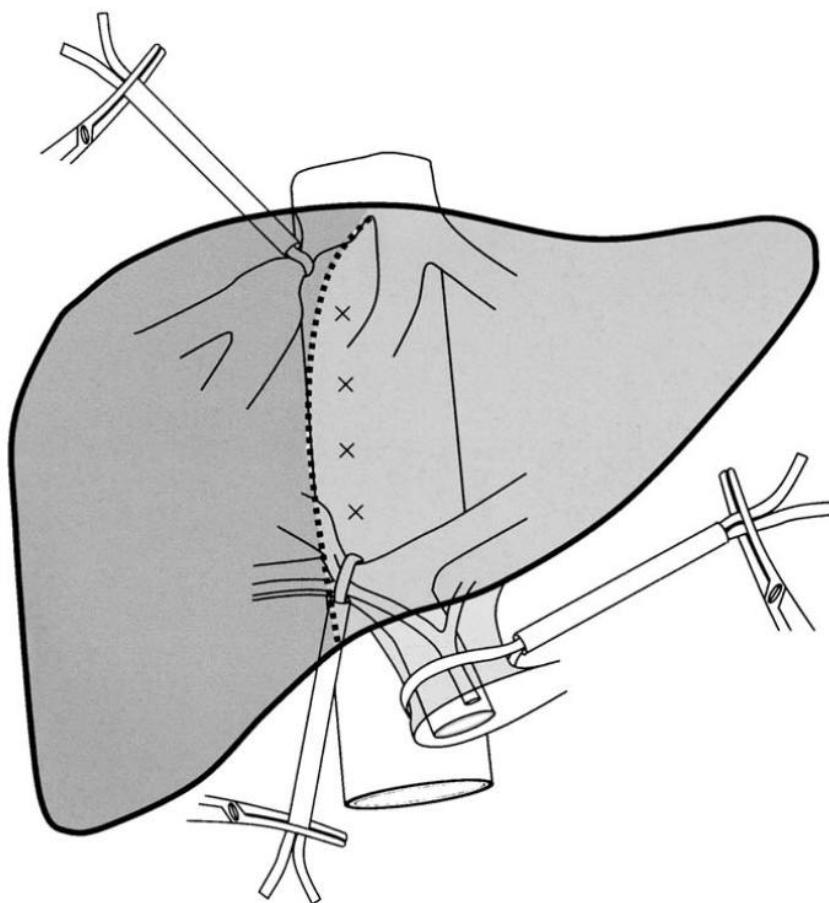


Figura 8. Clampagem hepática parcial, onde um setor hepático (direito ou esquerdo) é submetido à isquemia, enquanto o setor contralateral permanece com fluxo sanguíneo.

*No exemplo, clampagem do pedículo hepático direito (a clampagem total da tríade porta não será realizada e está representada apenas como manobra temporária antes da clampagem porta seletiva).*

Existem, na literatura, 16 ensaios randomizados abordando a clampagem hepática: cinco ensaios, incluindo 331 pacientes, comparando a utilização ou não da clampagem vascular; seis ensaios incluíram 521 pacientes e compararam diferentes métodos de oclusão vascular entre si; três ensaios, totalizando 210 pacientes, testaram a introdução de pré-condicionamento isquêmico antes da clampagem; e, finalmente, dois ensaios (incluindo 127 pacientes) compararam o

pré-condicionamento isquêmico antes da clampagem contínua ou intermitente. A revisão sistemática demonstrou que a oclusão vascular intermitente foi segura, porém sem nível de evidência suficiente para assegurar decréscimo na morbidade cirúrgica(46).

Delva et al(53), em estudo envolvendo 142 pacientes, observaram que a clampagem contínua por até 90 minutos, associada ou não à exclusão vascular total, não aumentou o tempo de internação hospitalar. Concluíram que a prioridade principal, durante as ressecções hepáticas, é o controle do sangramento, sendo que oclusões vasculares poderiam ser conduzidas com segurança por até 60 minutos. Outros constataram resultados semelhantes com clampagem de até 85 minutos, não observando alterações histológicas no fígado remanescente em avaliações tardias, de até um ano depois (54). Diferentes estudos não conseguiram determinar, efetivamente, o melhor método de clampagem, bem como o tempo seguro, limitando-se a concluir que os diferentes métodos podem ser utilizados em diferentes casos (especialmente com parênquima hepático anormal) e que a exclusão vascular total deve ser evitada (44, 45, 49, 50, 55, 56).

### **1.1.3 Apoptose**

A apoptose é um tipo especial de morte celular, onde a célula é estimulada a acionar mecanismos que culminarão com sua própria morte. Por isso, é também conhecida como suicídio celular (57-59).

Trata-se de morte celular programada e ativa, que requer energia, síntese e degradação protéica (58, 60). Por meio dela, os organismos vivos costumam eliminar as células potencialmente prejudiciais para que possam manter a homeostase (61, 62). Deste modo, ela constitui mecanismo fisiológico, de controle celular, que regula o tamanho dos tecidos exercendo um papel oposto ao da mitose (63).

A apoptose pode ocorrer fisiologicamente em cinco situações: em células que não possuem funções no organismo, em células geradas em excesso, em células que se desenvolvem de forma imprópria, em células que já desempenharam suas funções e naquelas que podem ser prejudiciais e devem ser eliminadas (64).

A ausência ou a exacerbação do fenômeno de apoptose pode resultar em conseqüências desastrosas para os tecidos (65). Dessa forma, sua inibição, está relacionada com o desenvolvimento de tumores, enquanto sua indução excessiva pode acarretar imunossupressão (58, 60) e também doenças auto-imunes e neuro-degenerativas, tais como a doença de Alzheimer (66).

Este tipo especial de morte celular pode também ocorrer como conseqüência a estímulos patológicos, tais como viroses, isquemia, hipertermia, infecções e toxinas bacterianas (67).

São varias as transformações celulares que caracterizam uma célula como apoptótica. À microscopia óptica, as células em apoptose apresentam-se retraídas, tipicamente circundadas por um halo claro e possuem citoplasma acidófilo. Seus núcleos sofrem uma série de alterações, incluindo marginação da cromatina, condensação e fragmentação, seguidas pela fragmentação da própria

célula em corpos apoptóticos (59). Estes podem apresentar fragmentos citoplasmáticos, nucleares ou ambos, e são reconhecidos e fagocitados por macrófagos ou células parenquimatosas adjacentes (68, 69).

Assim sendo, a morte celular via apoptose torna-se bem distinta daquela por necrose em vários aspectos (Figura 9). Na necrose, ocorre tumefação celular com subsequente perda da integridade da membrana plasmática e o conteúdo da célula é liberado ao espaço extracelular, o que conduz à resposta inflamatória naquela região. Além disso, a necrose acomete maior número de células sendo, portanto, tissular e ocorre sempre em caráter acidental ou provocado. A apoptose, por sua vez, caracteriza-se como morte silenciosa, pois o conteúdo da célula é transformado em corpos apoptóticos e estes são fagocitados por macrófagos ou pelas células adjacentes, não extravasando para o meio extracelular, ou seja, não há a indução de inflamação (70-72). Além disso, ela acomete as células isoladamente, não modificando a arquitetura tecidual e ocorre, na maioria das vezes, de forma programada e não de forma acidental (73).



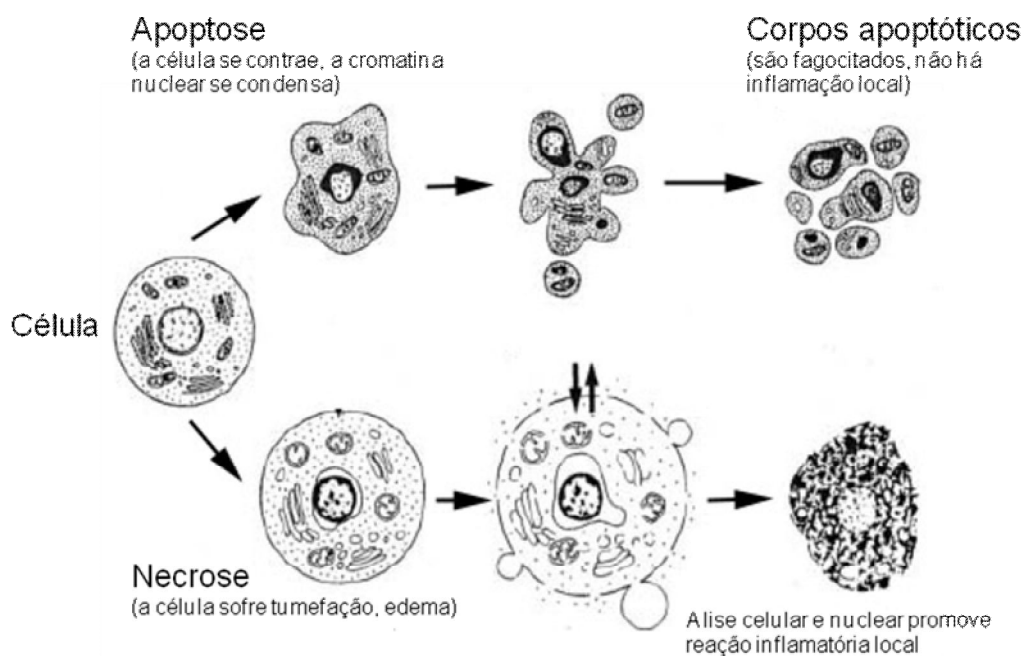


Figura 9. Representação da diferença entre apoptose e necrose.

A apoptose é frequentemente subestimada, pois é um evento rápido (que duraria de duas a três horas), afeta células individualmente e os corpos apoptóticos, além de pequenos, são rapidamente eliminados (74).

As mitocôndrias desempenham papel central na integração e propagação de sinais de morte celular que se originam do interior da célula, como a lesão do DNA, o estresse oxidativo e a falta de energia. A maior parte das condições que induzem apoptose envolve perda do potencial de membrana e aumento da permeabilidade de membrana mitocondrial a solutos, com tumefação mitocondrial pelo influxo de água na matriz e a liberação de proteínas pró-apoptóticas no citoplasma (75-78).

Atualmente, a morte celular só pode ser classificada como apoptótica se sua execução depender da atividade das caspases. Esse termo é derivado de *cysteine-dependent aspartate-specific proteases* (proteases aspartato-específicas

dependentes de cisteína). Essas proteases são de importância central no caminho de sinalização apoptótica e ativadas na maioria dos casos de apoptose. Em mamíferos, 14 diferentes caspases foram identificadas até hoje; elas são sintetizadas como zimogênios inativos, e chamadas, nessa fase, de pró-caspases (proteases com um terminal contendo duas sub-unidades, uma menor e uma maior, e um peptídeo de ligação). Por meio de complexas sinalizações e da ligação de receptores de morte celular da superfície celular (caminho extrínseco) ou em resposta a sinais do interior da célula (caminho intrínseco), elementos de ligação promovem a ativação das caspases, que podem ser pró-apoptóticas ou anti-apoptóticas (79-83).

A apoptose foi encontrada em vários órgãos após isquemia e reperfusão, incluindo o fígado (84-86). Foi encontrado aumento na intensidade de apoptose secundária a LIR, e se descobriu que sua ativação ocorre durante a fase inicial de reperfusão após a isquemia hepática (20, 87, 88). A apoptose demonstrou ser, para vários autores, um modo predominante de morte celular na LIR durante isquemia hepática normotérmica (89-91).

Na LIR hepática, a redução da síntese de ATP e a alteração de permeabilidade mitocondrial são os eventos que predis põem a apoptose, sendo que a primeira pode ser o evento de gatilho. Havendo quantidade suficiente de ATP haveria predominância de apoptose (ou seja, havendo áreas de mitocôndria preservadas que produziram ATP suficiente, e não alteração da membrana em toda a extensão da mitocôndria, o que levaria a morte celular por necrose) (92-97). A apoptose inicia-se na célula endotelial e progride para o hepatócito, sendo que esses processos ficam evidentes após a reperfusão (89, 91, 98, 99).

Em modelo experimental com ratos *Sprague-Dawley*, Baier et al. (100) constataram que, a partir de 15 minutos de isquemia, já ocorreu indução de apoptose detectável pelo método de TUNEL (101) na zona periportal. Nesse modelo foi observada apoptose na reperfusão em tempos variando de 30 minutos a duas horas de reperfusão. A determinação da apoptose foi feita por meio da digitalização de campos e obtenção de índice entre células apoptóticas e o total de células do campo.

Cursio (102) observou que a inibição das caspases protege o fígado da LIR em ratos. O bloqueio da apoptose foi proposto por Wang et al. (103) para proteção celular durante a isquemia-reperfusão hepática. A utilização da isquemia intermitente em modelo experimental por Crenesse et al. (104) reduziu a apoptose medida por expressão imunohistoquímica da caspase 3 e, além disso, demonstrou diferença significativa na marcação histoquímica de TUNEL entre fígado submetido a isquemias contínua e intermitente, em relação aos controles.

## **2 Objetivo**

2.1 Avaliar o dano celular hepático em coelhos submetidos à clampagem intermitente ou contínua do pedículo hepático (entre si e em relação a controles) utilizando parâmetros laboratoriais e morfológicos.

2.2 Trazer subsídios para definir a melhor maneira de efetuar a clampagem hepática em hepatectomias pelo conhecimento do dano celular associado a cada método de clampagem.

### **3 Material e Método**

#### **3.1 Parecer ético**

Esse trabalho foi realizado obedecendo as Normas Internacionais de Proteção aos Animais e o Código Brasileiro de Experimentação Animal (105, 106). O protocolo foi aprovado em 22 de novembro de 2006 pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), protocolo nº 170/06 (ANEXO A).

#### **3.2 Material**

##### **3.2.1 Animais de experimentação**

Foram utilizados 20 coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça *New Zealand*, machos, adultos, peso médio de  $2.218 \pm 404$  g (1.680 a 2.950 g), fornecidos pela Fazenda Veterinária da UFMG (Igarapé, MG).

Os animais foram submetidos à quarentena de quinze dias na Fazenda Veterinária. Após seu transporte para o Biotério da Faculdade de Medicina da UFMG, foram acomodados em gaiolas com iluminação ambiente com claridade diurna e ausência de luminosidade noturna e ficaram por três dias em adaptação, sob temperatura, umidade e ciclo de luz ambientes. No momento da admissão no Biotério da Faculdade de Medicina da UFMG, foram avaliados clinicamente,

pesados, distribuídos aleatoriamente em três grupos e mantidos em gaiolas individuais. Foi oferecida água *ad libitum* e ração para coelhos (*Nature Multivita® Socil Gyomarc*) à vontade, durante o período da experimentação. A tonsura abdominal para a realização da operação foi feita nesse período, entre 12 e 24 horas antes da realização dos procedimentos cirúrgicos.

### 3.2.2 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em três grupos conforme segue:

**Grupo 1 (n=5):** grupo controle (laparotomia sem clampagem do pedículo hepático);

**Grupo 2 (n=8):** clampagem contínua do pedículo hepático, seguida de reperfusão por 6 horas;

**Grupo 3 (n=7):** clampagem intermitente do pedículo hepático, seguida de reperfusão por 6 horas.

A anestesia foi realizada de acordo com uma das opções protocolares do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (107) para lagomorfos. Foi utilizada a associação dos anestésicos cetamina (na dose de 30 mg/Kg), xilazina (na dose de 5 mg/Kg) e acepromazina (na dose de 0,5 mg/Kg) por via intramuscular, em dose única, com repique de cetamina (na dose de 20 mg/Kg) após 30 minutos de procedimento, conforme necessidade. O jejum pré-operatório foi de 12 horas para sólidos. Não houve jejum para líquidos.

Os procedimentos cirúrgicos, por convenção, foram definidos como operação inicial e operação final, sendo a primeira com duração aproximada de 80 minutos e a segunda realizada seis horas após o término da primeira. Após a realização dos procedimentos da operação final se procedia a eutanásia. Para cada grupo, à definição da operação, foi acrescentada a convenção “grupo n”, de modo que as descrições operatórias são descritas como “operação inicial – grupo 1”, “operação inicial – grupo 2”, e assim por diante, conforme descrito a seguir. A operação final foi a mesma para todos os grupos. A figura 10 ilustra o passo inicial comum a todos os grupos, para a operação.

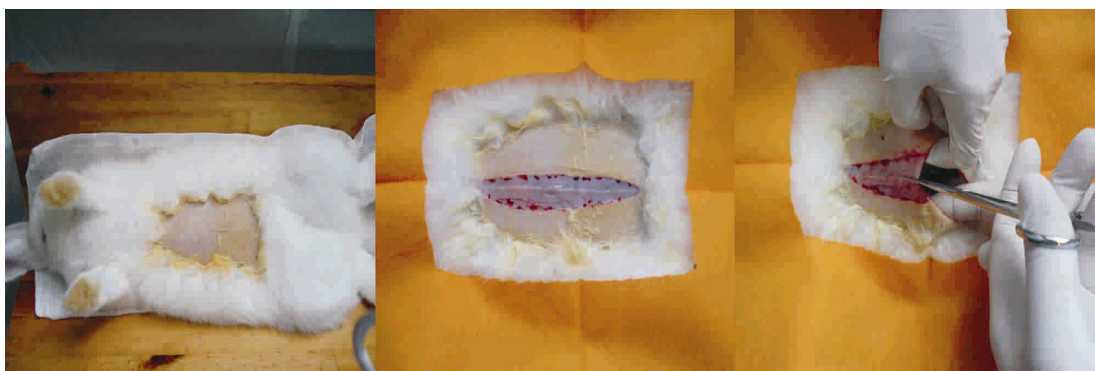


Figura 10. Procedimento cirúrgico sobre os animais de experimentação: I. Laparotomia.

Foram realizadas coletas de sangue de 3 ml – por punção da veia cava inferior sob visão direta – e biópsias hepáticas por fragmentos obtidos por incisão em cunha no lobo direito hepático e por aspiração utilizando kit comercial *Hepafix*®. Esses procedimentos ocorreram em três momentos distintos dos procedimentos cirúrgicos que foram denominados, para efeito de análise, em três “tempos”. A figura 11 ilustra o mecanismo de coleta do sangue, e a figura 12, a obtenção das biópsias.

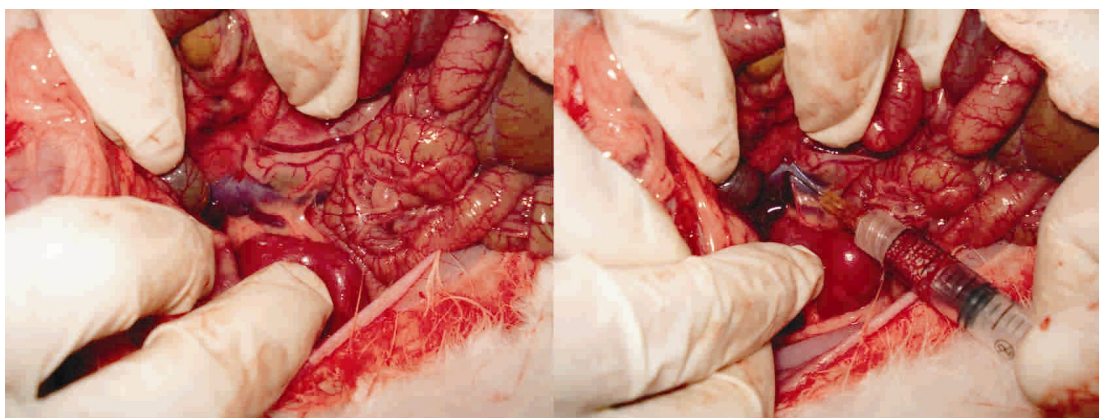


Figura 11. Procedimento cirúrgico sobre os animais de experimentação: II. Punção da veia cava inferior sob visão direta.

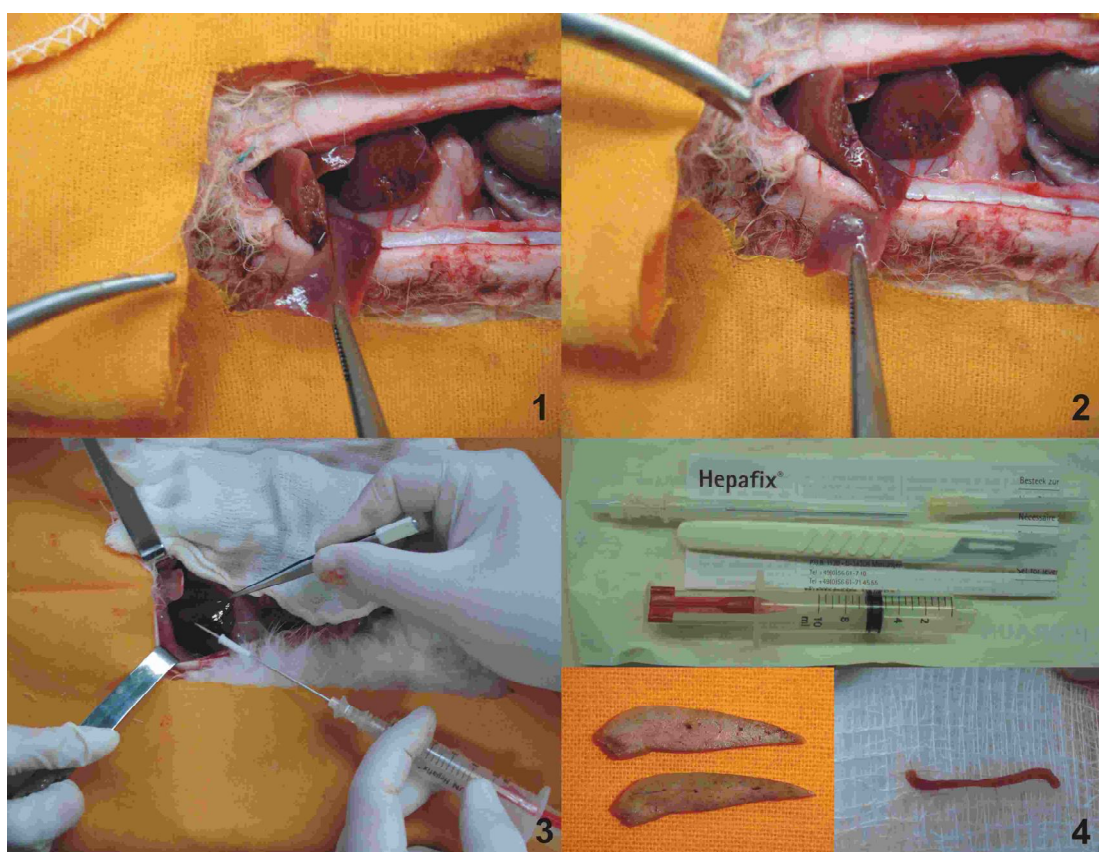


Figura 12. Biópsia hepática: 1 e 2. Fragmento de superfície (dissecção com tesoura); 3. Fragmento profundo (aspiração); 4. Kit comercial *Hepafix*® de biópsia aspirativa e aspecto dos fragmentos obtidos pelos dois métodos.



O tempo um ( $T_1$ ) correspondeu ao momento imediatamente após a laparotomia e antes da clampagem hepática; o tempo dois ( $T_2$ ) correspondeu ao momento imediatamente após o final da clampagem com a liberação final do mecanismo de isquemia (imediatamente ao término da primeira hora) e o tempo três ( $T_3$ ) correspondeu ao momento convencionado para estudo do efeito da reperfusão, ou seja, seis horas após o final da clampagem.

O protocolo das operações realizadas para os três grupos de animais foi o seguinte:

Operação Inicial – Grupo 1

Anestesia geral intramuscular;

Anti-sepsia abdominal com solução PVPI degermante;

Laparotomia xifopúbica;

Identificação e dissecação do pedículo hepático;

Coletas de sangue (veia cava inferior) e de duas biópsias hepáticas ( $T_1$ );

Manutenção do abdome aberto por uma hora (protegido por compressa úmida);

Revisão da hemostasia conforme necessário;

Coletas de sangue (veia cava inferior) e de duas biópsias hepáticas ( $T_2$ );

Sutura da parede por planos anatômicos.

Operação Inicial – Grupo 2

Anestesia geral intramuscular;

Anti-sepsia abdominal com solução PVPI degermante;

Laparotomia xifopúbica;

Identificação e dissecação do pedículo hepático;

Coletas de sangue (veia cava inferior) e de duas biópsias hepáticas (T<sub>1</sub>);

Clampagem do pedículo hepático pelo período de 60 minutos de forma contínua, conforme descrição adiante (abdome mantido aberto durante este período e protegido por compressa úmida);

Revisão da hemostasia;

Coletas de sangue (veia cava inferior) e de duas biópsias hepáticas (T<sub>2</sub>) (imediatamente após a desclampagem);

Sutura da parede por planos anatômicos.

Operação Inicial – Grupo 3

Anestesia geral intramuscular;

Anti-sepsia abdominal com solução PVPI degermante;

Laparotomia xifopúbica;

Identificação e dissecação do pedículo hepático;

Coletas de sangue (veia cava inferior) e de duas biópsias hepáticas (T<sub>1</sub>);

Clampagem do pedículo hepático pelo período de 60 minutos de forma intermitente, conforme descrição adiante;

Revisão da hemostasia;

Coletas de sangue (veia cava inferior) e de duas biópsias hepáticas (T<sub>2</sub>);

Sutura da parede por planos anatômicos.

Ao final da operação inicial, o animal recebeu infusão de líquidos cristalóides por via intraperitoneal, de modo que a reposição de cada 0,6 ml de sangue perdido por punção foi feita com 2,1 ml de solução salina a 0,9%. Após o procedimento, os animais foram acondicionados em gaiolas individuais em

decúbito lateral enquanto se recuperavam da anestesia, e permaneceram em observação por seis horas. Após esse período foi realizado o segundo procedimento cirúrgico conforme descrito a seguir.

Operação Final – Todos os grupos

Anestesia geral intramuscular;

Anti-sepsia abdominal com solução PVPI degermante;

Relaparotomia xifopúbica pela secção dos pontos de sutura prévia;

Coletas de sangue (veia cava inferior) e de duas biópsias hepáticas (T<sub>3</sub>);

Infusão de dose letal de anestésico por via intravenosa (pentobarbital sódico na dose de 90 mg/Kg) por punção direta da veia cava inferior.

Exsanguinação pela secção da veia cava inferior e aorta abdominal.

A clampagem contínua do pedículo hepático foi realizada por 60 minutos por meio da manobra de Pringle, utilizando-se, para tal, mecanismo simples envolvendo uma fita cardíaca, um segmento de látex tubular de uso cirúrgico e uma pinça de hemostasia auto-estática com cremalheira, conforme mostrado na figura 13. A clampagem contínua era realizada por todo o tempo sem que o mecanismo fosse alterado, enquanto que a clampagem intermitente era realizada pelo mesmo tempo, mas com intervalos de três minutos de reperfusão a cada 12 minutos de isquemia, pela liberação da tensão do mecanismo (sem retirá-lo). A aferição do tempo foi realizada com cronógrafo digital.

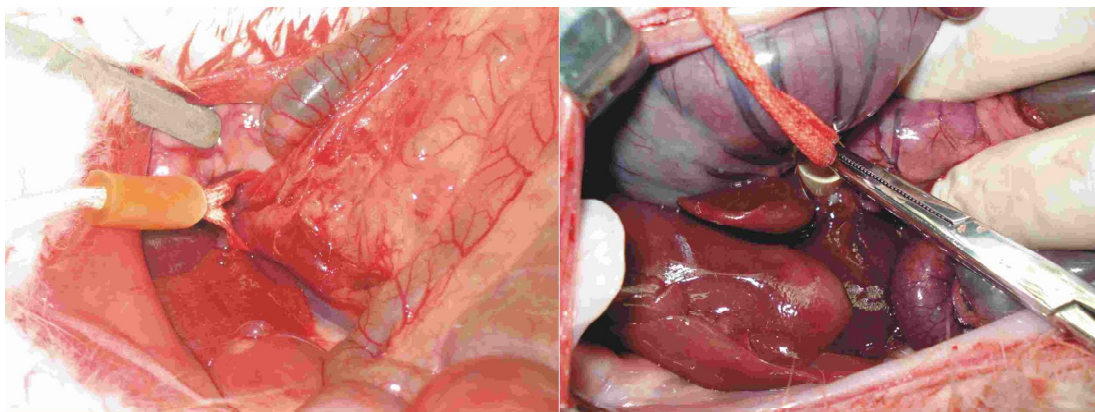


Figura 13. Mecanismo utilizado para clampagem do pedículo hepático no animal de experimentação, demonstrando a isquemia obtida (à direita). Animal de exemplo do grupo 2, animal 5.

No sangue coletado nos diferentes tempos foram avaliados os níveis séricos de aspartato-aminotransferase (AST), alanino-aminotransferase (ALT), bilirrubina total (BT), fosfatase alcalina (FA), gama glutamil-transferase (GGT) e desidrogenase láctica (DHL). As análises bioquímicas séricas foram realizadas em laboratório de análises clínicas veterinárias (Laboratório do Hospital Veterinário da UFMG).

O estudo morfométrico dos fragmentos hepáticos foi efetuado da seguinte maneira: um fragmento de biópsia, de cada tempo, foi colocado em frasco apropriado, individualizado e identificado, contendo solução tampão PBS (0,01M fosfato de sódio; 0,1M NaCl, pH 7,3) com glicerina (pH 6,0) a  $-20^{\circ}\text{C}$ , em vasilhame contendo gelo seco, sendo, a seguir, transportado para armazenamento no Laboratório de Apoptose do ICB-UFMG, em refrigerador a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Esses fragmentos permanecem armazenados até a confecção dessa dissertação e não foram utilizados para esse estudo. Os outros fragmentos de biópsia (de cada tempo) foram acondicionados em frascos individualizados e identificados,

contendo solução de formaldeído tamponado a 10% em temperatura ambiente. Esse material foi encaminhado ao Laboratório de Patologia da Santa Casa de Misericórdia de Maceió para estocagem e processamento histológico com inclusão em blocos de parafina e coloração ou silanização. Posteriormente, as lâminas silanizadas foram encaminhadas ao Laboratório de Apoptose do ICB-UFMG para processamento histoquímico.

### 3.2.3 Processamento Histológico

As amostras de fígado foram processadas por técnica rotineira de inclusão em parafina, sendo que as secções obtidas foram coradas com hematoxilina-eosina (108) ou submetidas à reação de TUNEL (101).

Os resultados foram obtidos por avaliação quantitativa de cortes histológicos processados com coloração de hematoxilina e eosina e qualificado pela avaliação de cortes histológicos aleatoriamente retirados da amostra que foram submetidos à reação de TUNEL (identificação da fragmentação de sítio do genoma / apoptose). Após avaliação qualitativa preliminar, as lâminas foram digitalizadas e analisadas em programa de morfometria computadorizada *UTHSCSA Image Tool for Windows* (109), para cálculo do índice apoptótico.

A ocorrência de apoptose foi confirmada pela evidenciação da fragmentação do DNA genômico por meio da reação de TUNEL. Foi utilizado um kit comercial para a detecção *in situ* da fragmentação do genoma (*Klenow FragEl DNA fragmentation Detection Kit* - no Catálogo QIA21; *Calbiochem / Oncogene*, disponível no sítio da internet <http://calbiochem.com/>). Foi seguido o protocolo

especificado pelo fabricante. As lâminas eram desparafinizadas por imersão em xilol e álcool, em diluições decrescentes, e, a seguir, eram lavadas duas vezes com água destilada. Em seguida, a peroxidase endógena era inativada, cobrindo-se as secções com água oxigenada a 3%, por 5 minutos. As lâminas eram lavadas em PBS e imersas em solução tampão de equilíbrio. Os cortes foram cobertos com TdT (transferase terminal de deoxinucleotídeos), UTP e digoxigenina e colocadas em atmosfera úmida a 37°C por 2 horas. Os cortes foram incubados por 10 minutos, com o tampão de lavagem e parada, aplicando-se o conjugado anti-digoxigenina peroxidase sobre as lâminas que eram colocadas em uma câmara umidificada a 37°C por 18 horas (incubação *overnight*). As lâminas eram novamente imersas em PBS, tratadas com diaminobenzina por 6 minutos para revelação da reação, lavadas com água destilada, coradas com o corante *metil green* e montadas para avaliação microscópica.

### 3.2.4 Morfometria

#### 3.2.4.1 Digitalização dos campos

Cada corte histológico com a coloração HE teve campos aleatórios capturados em formato digital em um aumento de 400 vezes (Figura 14). A digitalização foi realizada por microscópio de sistema óptico universal com objetiva planacromática de aumento igual a 400 vezes (modelo *Olympus*<sup>®</sup> *CX-41*; Estados Unidos) conectado a câmera colorida (modelo *JVC*<sup>®</sup> *TK-1270*; Estados Unidos). O programa de computador utilizado para essa captura foi o *Honestech TVR*<sup>®</sup> versão 2.5 para *Windows*<sup>®</sup> (Laboratório de Morfometria Digital do ICB-UFMG).

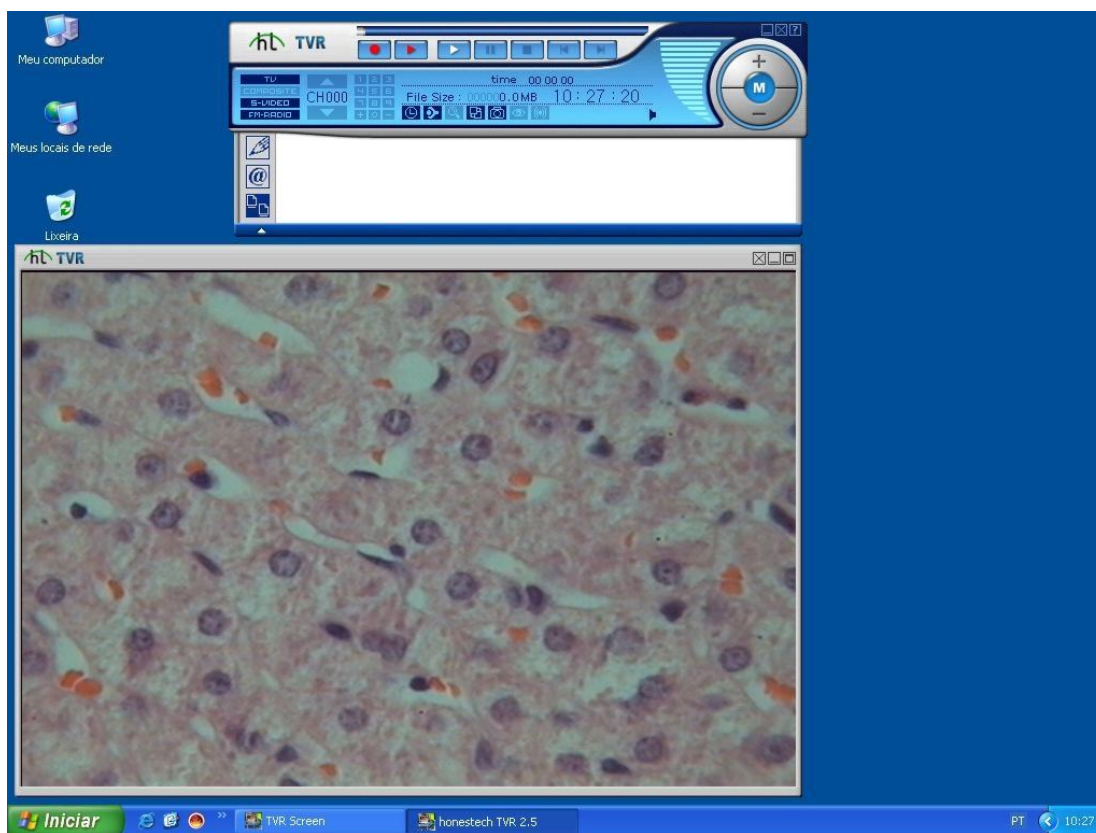


Figura 14. Digitalização dos campos em aumento de 400x.

### 3.2.4.2 Análise Morfométrica e Quantificação do Índice apoptótico

Foram feitas as contagens dos hepatócitos em apoptose e dos hepatócitos totais em cada campo. As células foram consideradas como apoptóticas quando apresentavam, pelo menos, três dos seguintes achados: 1) Anoiquia (retração celular com perda da adesão com as células vizinhas); 2) Condensação citoplasmática; 3) Condensação nuclear (condensação da cromatina nuclear, às vezes permeando a parte superior da membrana nuclear e exibindo figuras de “crescentes”; 4) Fragmentação nuclear; 5) Formação de corpos apoptóticos.



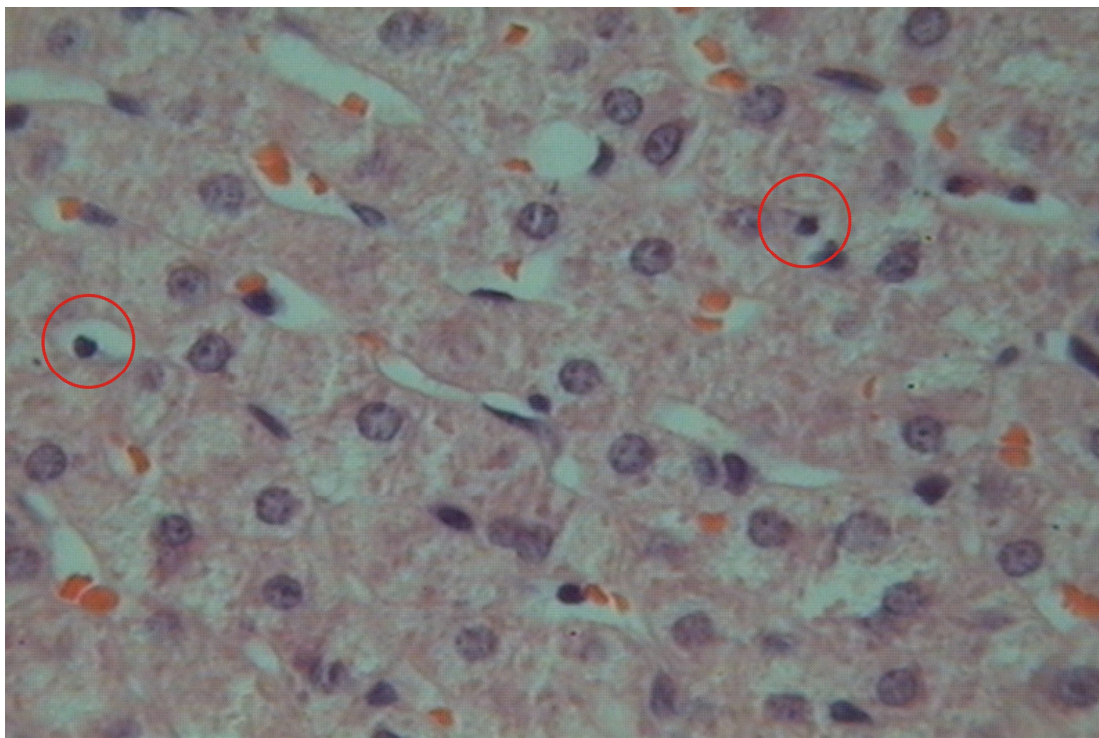


Figura 15. Identificação de células em apoptose em um campo digitalizado. Os dois círculos vermelhos destacam duas células em apoptose, apresentando anoiquia e condensação nuclear. Fragmento corado com hematoxilina-eosina, 400x.

A quantificação dos índices apoptóticos foi realizada por meio de ensaio cego, por um mesmo observador, utilizando o programa de análise de imagens *UTHSCSA Image Tool for Windows*<sup>®</sup> (109), conforme demonstrado na figura 16. O mascaramento do estudo consistiu na contagem do conjunto de arquivos digitais nomeados a partir da data e hora de obtenção da foto digital. Não houve identificação do grupo ou tempo a que pertencia cada imagem.

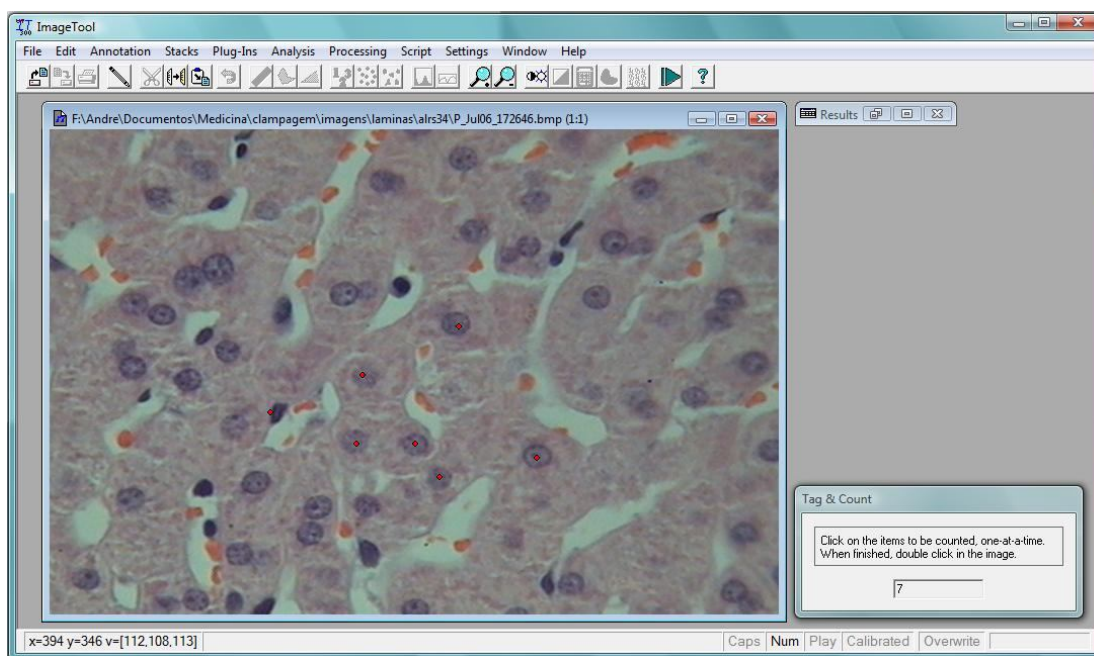


Figura 16. Quantificação de células em apoptose em um campo digitalizado com o software *Image Tool for Windows*<sup>®</sup>.

O Índice Apoptótico (IA) foi obtido pela seguinte fórmula:

$$IA = \frac{\text{número de células em apoptose}}{\text{número de células totais}} \times 100$$

### 3.2.4.3 Determinação do número mínimo de campos representativos

O coeficiente de variância (CV) foi utilizado para determinar o número mínimo de campos microscópicos a serem analisados para obtenção de representatividade estatística. A análise do CV de contagens sucessivas de campos histológicos foi realizada com uma modificação do método já utilizado pela equipe do Laboratório de Apoptose (110) onde o desvio padrão foi substituído pelo erro padrão para o cálculo desse coeficiente.

O método consistiu na obtenção de sub-grupos menores de uma amostra de 100 campos aleatórios diferentes, numerados de um a 100, de uma lâmina corada com HE aleatoriamente escolhida na amostra. Foram sorteados sub-grupos com número crescente de campos, com as quantidades totais estabelecidas de modo seqüencial com 5, 8, 10, 12, 15, 18, 20, 23 e 25 campos. Esses campos foram sorteados e repostos para o sorteio do sub-grupo subsequente.

A análise dos valores obtidos foi feita pelo cálculo estatístico descritivo do conjunto de índices apoptóticos obtidos em cada sub-grupo, com a obtenção de média, erro padrão e coeficiente de variância dos valores dispersos em torno da média para cada conjunto de dados.

Foi utilizada a seguinte fórmula para obtenção do CV:

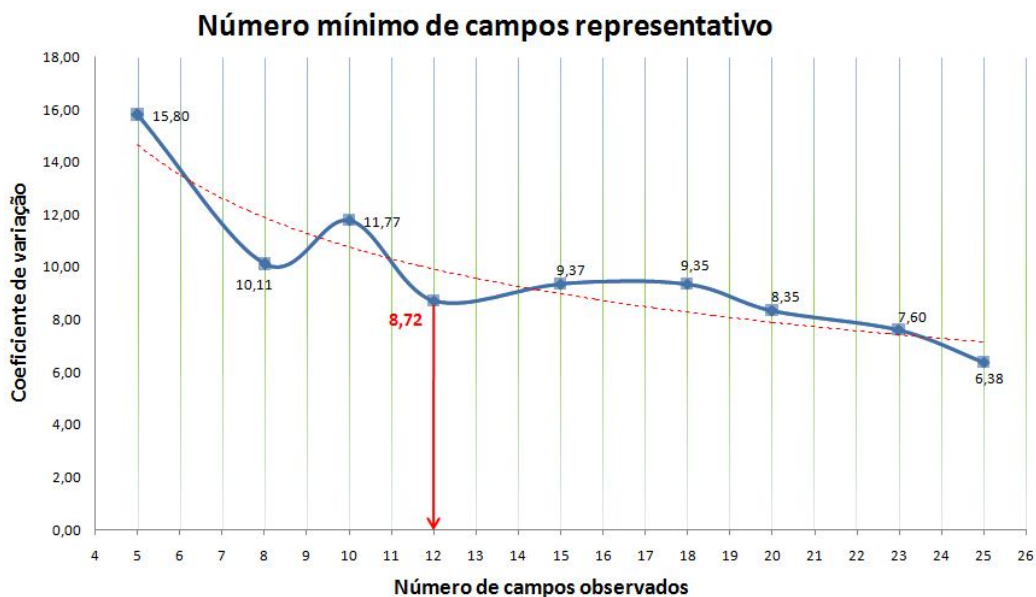
$$CV = \frac{\text{erro padrão}}{\text{média}} \times 100$$

Os sucessivos CV foram analisados graficamente até a obtenção da estabilização da curva. Foi estabelecido previamente que o CV teria que ser inferior a 20% na amostra independentemente do ponto da curva. Isso ocorreu na análise em todos os sub-grupos. Assim, o tamanho da amostra considerado como mínimo representativo foi definido quando o incremento do número de campos não resultou em redução considerável no valor do CV, o que ocorreu após a contagem de 12 campos, conforme observado na tabela 1 e no gráfico 1.

Tabela 1. Coeficientes de variância obtidos para os índices apoptóticos de cada conjunto de campos estudados.

Número de campos	IA médio	Erro padrão	Coeficiente de variância
5	7,01	1,11	15,80
8	7,26	0,73	10,11
10	7,43	0,87	11,77
12	6,97	0,61	8,72
15	5,67	0,53	9,37
18	6,66	0,62	9,35
20	5,84	0,49	8,35
23	7,78	0,59	7,60
25	6,93	0,44	6,38

Gráfico 1. Resultado da análise para determinação do número mínimo de campos representativos (com a curva de tendência em serrilhado na cor vermelha).



Para se confirmar a estabilidade da curva, a variação entre coeficientes dentro do conjunto considerado estável deveria ser inferior a 20%. O quadro 1

apresenta estatística descritiva dos valores considerados estáveis (12, 15, 18, 20, 23 e 25 campos), mostrando CV de 5,66%.

Tabela 2. Estatística descritiva dos valores estáveis da curva de CV.

Medida-resumo numérica	Valor
Média	8,30
Erro padrão	0,47
Variância da amostra	1,32
Coeficiente de variância	5,66

#### **3.2.4.4. Qualificação do índice apoptótico com a reação de TUNEL**

A qualificação dos resultados obtidos com a análise morfométrica realizadas nas lâminas coradas com HE foi feita da seguinte maneira: foi realizada seleção aleatória de lâminas, em número de 20% do total de lâminas, uniformemente nos diferentes grupos estudados; essas lâminas, que representavam índices apoptóticos mais baixos e mais altos, foram submetidas à reação de TUNEL conforme descrito, e campos com aumento de 400x foram digitalizados de modo idêntico ao descrito para as lâminas coradas com HE.



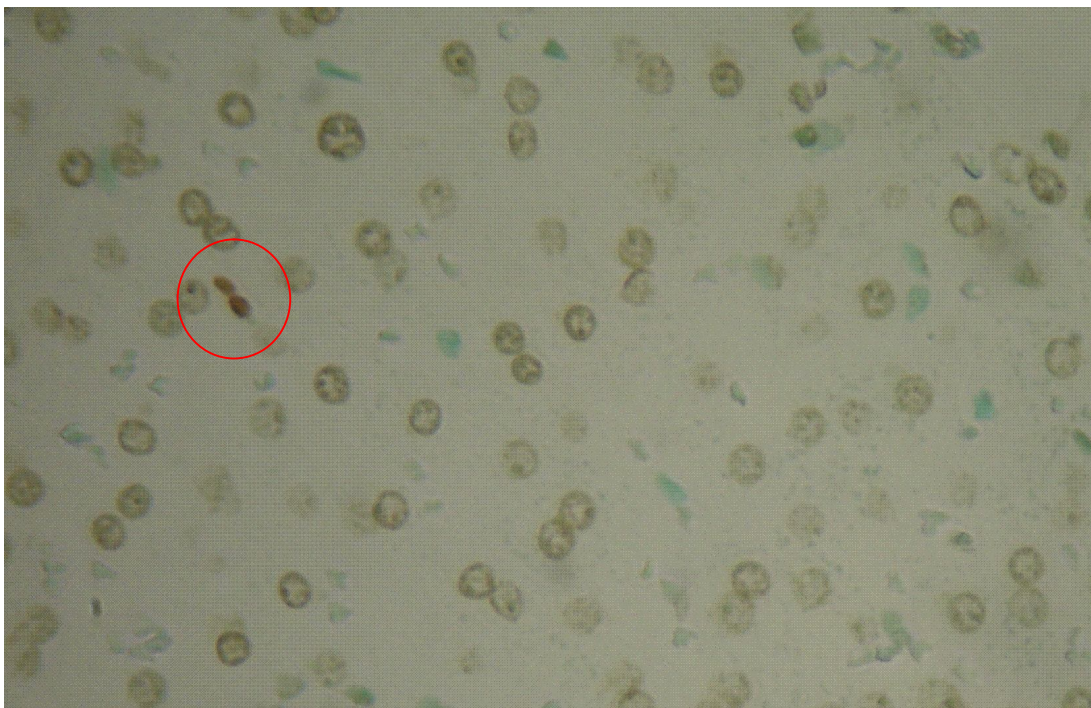


Figura 17. Campo digitalizado obtido a partir de lâmina submetida à reação de TUNEL, evidenciando uma figura isolada de apoptose (núcleo corado denso circulado em vermelho). TUNEL, 400x.

### 3.3 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. Todos os dados obtidos por esse estudo foram variáveis contínuas e paramétricas. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a normalidade da distribuição das amostras. Uma vez que se trataram de comparações de duas intervenções entre si e sobre controles, utilizou-se o teste T de Student em amostras independentes para a análise inter-grupos, e em amostras pareadas para a análise intra-grupo. O teste de Levene foi utilizado para avaliar a ocorrência de igualdade ou diferença de variância nas amostras independentes. Os valores de p

inferiores a 0,05 foram considerados significativos, ou seja, com intervalo de confiança de 95%. Foram utilizados os programas de computador *SPSS*<sup>®</sup> para *Windows*<sup>®</sup> versão 10.0 e *GraphPad Prism*<sup>®</sup> para *Windows*<sup>®</sup> versão 4.00.

## **4 Resultados**

### **4.1 Adaptação dos animais**

Os coelhos aparentaram adaptação normal ao ambiente do biotério e nenhum deles apresentou manifestações clínicas de doença. A alimentação oferecida foi consumida normalmente. Não houve necessidade de substituição de nenhum animal.

### **4.2 Ato cirúrgico e evolução pós-operatória**

Em todos os animais operados e incluídos na amostra experimental, o aspecto da cavidade abdominal e seus órgãos foi normal e não houve intercorrência trans ou pós-operatória. Após três ou quatro horas do início da operação inicial, os animais se mostravam acordados e permaneciam em repouso em suas gaiolas individuais. Não houve qualquer alteração comportamental, tampouco achado cirúrgico diverso na operação final para qualquer animal.

### **4.3 Análise bioquímica**

Para avaliação dos dados bioquímicos coletados, foram feitas análises pareadas, com o objetivo de verificar a variação individual intra-grupo, bem como análises independentes, para verificar a variação inter-grupos, todas utilizando o



teste T de Student. Para os testes independentes, foi aplicado o teste de Levene para verificar a igualdade de variância entre os grupos.

#### 4.3.1 Análise da distribuição

O teste de Kolmogorov-Smirnov (K-S) foi utilizado para verificar a normalidade da distribuição das amostras. Para todos os exames testados, a distribuição foi considerada normal, conforme descrito na tabela 3.

Tabela 3. Resultado do teste K-S para verificação de normalidade nos grupos experimentais subdivididos nos três tempos do experimento.

Kolmogorov-Smirnov		Distância K-S	Valor P	Alpha=0,05
FA	T1	0,1445	P > 0.10	Sim
	T2	0,0910	P > 0.10	Sim
	T3	0,1147	P > 0.10	Sim
DHL	T1	0,1709	P > 0.10	Sim
	T2	0,1020	P > 0.10	Sim
	T3	0,1527	P > 0.10	Sim
BT	T1	0,1869	P > 0.10	Sim
	T2	0,1129	P > 0.10	Sim
	T3	0,1853	P > 0.10	Sim
GGT	T1	0,1780	P > 0.10	Sim
	T2	0,2653	P > 0.10	Sim
	T3	0,1430	P > 0.10	Sim
AST	T1	0,1689	P > 0.10	Sim
	T2	0,1757	P > 0.10	Sim
	T3	0,1197	P > 0.10	Sim
ALT	T1	0,2850	P > 0.10	Sim
	T2	0,2396	P > 0.10	Sim
	T3	0,1600	P > 0.10	Sim

### 4.3.1 Análise intra-grupo

#### 4.3.1.1 Grupo 1 (controle)

Nesse grupo, a análise demonstrou que não houve diferença entre os valores séricos dos exames realizados. Entretanto, observamos tendência da DHL e da AST a apresentarem variação entre os T1 e T3, conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4. Análise dos marcadores bioquímicos no grupo controle (teste T de Student com amostras pareadas).

Par	Diferença pareada			Valor p
	Média*	Desvio padrão	Erro padrão	
FA1 - FA2	19,00	19,77	9,88	0,150
FA1 - FA3	8,60	53,96	24,13	0,740
FA2 - FA3	-9,00	44,94	22,47	0,716
DHL1 - DHL2	-138,20	158,42	70,85	0,123
DHL1 - DHL3	-403,75	264,58	132,29	0,055
DHL2 - DHL3	-221,25	230,91	115,46	0,151
BT1 - BT2	-0,0100	0,08515	0,03808	0,806
BT1 - BT3	-0,098	0,1525	0,06822	0,224
BT2 - BT3	-0,088	0,2000	0,08947	0,381
GGT1 - GGT2	-4,60	12,10	5,41	0,443
GGT1 - GGT3	-1,60	6,27	2,80	0,599
GGT2 - GGT3	3,00	17,68	7,91	0,724
AST1 - AST2	-25,40	29,99	13,41	0,131
AST1 - AST3	-130,75	88,50	44,25	0,060
AST2 - AST3	-103,25	82,05	41,03	0,086
ALT1 - ALT2	-21,40	25,34	11,33	0,132
ALT1 - ALT3	-142,40	188,52	84,31	0,166
ALT2 - ALT3	-121,00	168,34	75,28	0,183

\* valores em U/l, exceto BT (mg/dl).

#### 4.3.1.2 Grupo 2 (isquemia contínua)

Nesse grupo, a análise demonstrou que a isquemia provocou aumento entre os valores séricos da DHL (T1 *versus* T2 e T1 *versus* T3), AST (T1 *versus* T2) e ALT (todos os tempos). Os resultados estão sumariados na tabela 5.

Tabela 5. Análise pareada dos marcadores bioquímicos no grupo isquemia contínua (teste T de Student com amostras pareadas).

Par	Diferença pareada			Valor p
	Média**	Desvio padrão	Erro padrão	
FA1 - FA2	-13,13	26,49	9,36	0,204
FA1 - FA3	-48,88	73,79	26,09	0,103
FA2 - FA3	-35,75	58,11	20,55	0,125
DHL1 - DHL2	-395,63	306,57	108,39	<b>0,008*</b>
DHL1 - DHL3	-671,13	315,00	111,37	<b>0,001*</b>
DHL2 - DHL3	-275,50	519,00	183,49	0,177
BT1 - BT2	-0,015	0,08502	0,03006	0,633
BT1 - BT3	-0,035	0,09196	0,03251	0,317
BT2 - BT3	-0,02	0,06071	0,02146	0,382
GGT1 - GGT2	0,25	7,65	2,70	0,929
GGT1 - GGT3	-0,50	5,45	1,93	0,803
GGT2 - GGT3	-0,75	4,89	1,73	0,678
AST1 - AST2	-61,75	42,93	15,18	<b>0,005*</b>
AST1 - AST3	-25,63	49,23	17,41	0,184
AST2 - AST3	36,13	67,25	23,78	0,172
ALT1 - ALT2	-75,29	68,85	26,02	<b>0,028*</b>
ALT1 - ALT3	-161,14	116,56	44,06	<b>0,011*</b>
ALT2 - ALT3	-85,86	85,94	32,48	<b>0,038*</b>

\* diferença significativa.

\*\* valores em U/l, exceto BT (mg/dl).

Dentre os marcadores que apresentaram diferença com a intervenção, para DHL e ALT os valores subiram de modo constante, não tendendo a retornar aos níveis pré-isquemia; para AST isso não ocorreu, de modo que no tempo três

(T3) foi verificado retorno aos valores iniciais (com  $p=0,184$ ). As médias de interesse estão descritas na tabela 6.

Tabela 6. Médias de DHL, AST e ALT no grupo isquemia contínua (valores em U/l).

	DHL			AST			ALT		
	T1	T2	T3	T1	T2	T3	T1	T2	T3
Média	402,88	798,50	1074,00	50,75	112,50	76,38	66,00	141,29	227,14
DP	211,41	348,39	420,84	22,02	43,01	60,63	29,83	81,87	124,05

#### 4.3.1.3 Grupo 3 (isquemia intermitente)

Nesse grupo, a análise demonstrou que a isquemia provocou aumento entre os valores séricos da FA (T1 *versus* T2), DHL (T1 *versus* T3), BT (T1 *versus* T2) e AST (T1 *versus* T2 e T1 *versus* T3). Os resultados estão descritos na tabela 7.

Tabela 7. Análise pareada dos marcadores bioquímicos no grupo isquemia intermitente.

Par	Diferença pareada			Valor p
	Média	Desvio padrão	Erro padrão	
FA1 - FA2	-29,00	21,66	8,84	<b>0,022*</b>
FA1 - FA3	-24,00	27,91	11,40	0,089
FA2 - FA3	3,86	28,05	10,60	0,728
DHL1 - DHL2	-380,67	424,69	173,38	0,080
DHL1 - DHL3	-500,50	382,33	156,09	<b>0,024*</b>
DHL2 - DHL3	-116,43	243,46	92,02	0,253
BT1 - BT2	-0,072857	0,05219	0,01973	<b>0,010*</b>
BT1 - BT3	-0,015714	0,1225	0,04628	0,746
BT2 - BT3	0,05714	0,09995	0,03778	0,181
GGT1 - GGT2	2,86	3,48	1,32	0,073
GGT1 - GGT3	-3,43	13,24	5,00	0,519
GGT2 - GGT3	-6,29	10,63	4,02	0,169
AST1 - AST2	-83,86	42,96	16,24	<b>0,002*</b>
AST1 - AST3	-113,57	102,26	38,65	<b>0,026*</b>
AST2 - AST3	-29,71	79,12	29,90	0,359
ALT1 - ALT2	-24,00	51,77	21,14	0,308
ALT1 - ALT3	-101,75	90,07	45,04	0,109
ALT2 - ALT3	-46,25	76,38	38,19	0,313

\* diferença significante.

\*\* valores em U/l, exceto BT (mg/dl).

Conforme demonstrado na tabela 8, as médias de FA e AST apresentaram aumento e permaneceram sem retornar aos níveis iniciais, embora tenha sido observada significância nessa diferença apenas para a última ( $p=0,026$  para AST) e uma tendência para FA ( $p=0,089$ ). Para a BT, os níveis tenderam a retornar para os níveis iniciais, porém sem significância ( $p=0,746$ ), e para a DHL as médias aumentaram progressivamente mas não houve diferença com a intervenção mas apenas após a reperfusão, na comparação entre os tempos um e três (DHL1-DHL2:  $p=0,080$  e DHL1-DHL3:  $p=0,024$ ).

Tabela 8. Médias de FA, DHL, BT e AST no grupo isquemia intermitente.

		Média	Desvio padrão
Fosfatase alcalina (FA)	T1	228,67	54,90
	T2	257,67	65,38
	T3	255,00	44,96
Desidrogenase láctica (DHL)	T1	330,33	171,30
	T2	711,00	292,14
	T3	758,86	289,05
Bilirrubina total (BT)	T1	0,1186	0,03805
	T2	0,1914	0,05146
	T3	0,1343	0,1175
Aspartato-aminotransferase (AST)	T1	64,00	21,19
	T2	147,86	34,29
	T3	177,57	84,07

\* valores em U/l.

#### 4.3.2 Análise inter-grupos

Nessa análise a grande maioria dos testes não apresentou diferença significativa para os diversos grupos e tempos, exceto para AST após a reperfusão (T3), que apresentou diferença do grupo de isquemia contínua em relação aos controles e entre os grupos de isquemia, e para FA após a isquemia, que apresentou diferença entre os grupos de isquemia contínua e intermitente. Os resultados com significância encontram-se resumidos na tabela 9.

Tabela 9. Diferenças encontradas na análise inter-grupos pelo teste T independente.

Grupos	Análise		Teste de Levene		Teste T independente
	Marcador	Tempo	F	Sig.	p
Controle <i>versus</i> Isquemia contínua	AST	T3	0,111	0,746	0,039
Isquemia contínua <i>versus</i> Isquemia intermitente	AST	T3	1,080	0,318	0,018
	FA	T2	0,502	0,491	0,019

## 4.4 Quantificação da apoptose nos fragmentos hepáticos

### 4.4.1 Análise da distribuição e de médias

As médias dos IA obtidos nos diferentes grupos e tempos foram submetidas à análise de distribuição normal pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Todos os grupos com suas médias subdivididas em tempos apresentaram distribuição normal, conforme descrito na tabela 10.

Tabela 10. Resultado do teste K-S para normalidade nos grupos experimentais subdivididos nos três tempos do experimento.

Kolmogorov-Smirnov	Distância K-S	Valor P	Alpha=0,05	
Grupo 1	T1	0,2223	P > 0.10	Sim
	T2	0,2093	P > 0.10	Sim
	T3	0,2346	P > 0.10	Sim
Grupo 2	T1	0,1545	P > 0.10	Sim
	T2	0,2541	P > 0.10	Sim
	T3	0,2022	P > 0.10	Sim
Grupo 3	T1	0,2845	P > 0.10	Sim
	T2	0,2535	P > 0.10	Sim
	T3	0,1885	P > 0.10	Sim

O índice apoptótico em T1 também se apresentou com distribuição normal para todos os grupos em conjunto; o teste de Kolmogorov-Smirnov apresentou distância K-S igual a 0,1746, com  $p > 0,10$  e  $\alpha = 0,05$ ; o CV nesse tempo, inter grupos, foi de 6,98%.

As médias dos índices apoptóticos nos grupos apresentaram a distribuição constante na tabela 11, quando se encontrou aparente uniformidade do índice no grupo controle; nos grupos de isquemia contínua e isquemia intermitente, houve elevação do IA que após seis horas de reperfusão retornou a índices próximos

dos iniciais no grupo 2 e inferiores a esses no grupo 3. As médias encontradas foram seqüencialmente analisadas de forma independente e pareada, para as análises intra e inter-grupos.

Tabela 11. Médias dos índices apoptóticos nos grupos, de acordo com o momento do experimento (tempo).

Médias	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3
Grupo 1	7,32	7,36	7,32
Grupo 2	7,77	8,78	7,83
Grupo 3	7,93	8,64	7,79

#### 4.4.2 Análise intra-grupo

No grupo controle, a análise demonstrou que não houve diferença entre os IA em nenhum momento do protocolo, conforme descrito na tabela 12.

Tabela 12. Análise pareada dos índices apoptóticos no grupo controle.

Par	Diferença pareada			Valor p
	Média	Desvio padrão	Erro padrão	
IA1 - IA2	-0,38	0,18	0,81	0,666
IA2 - IA3	0,46	0,22	0,98	0,664
IA1 - IA3	0,08	0,17	0,74	0,920

No grupo 2, encontrou-se diferença significativa no final da isquemia em relação ao início do experimento e a reperfusão foi capaz de alterar o IA em relação ao final da isquemia de modo a produzir diferença significativa; o IA ao final da reperfusão foi igual ao do início do experimento, nesse grupo.



Tabela 13. Análise pareada dos índices apoptóticos no grupo de isquemia contínua.

Par	Diferença pareada			Valor p
	Média	Desvio padrão	Erro padrão	
IA1 - IA2	-1,01	0,56	0,20	<b>0,001*</b>
IA2 - IA3	0,95	0,53	0,19	<b>0,002*</b>
IA1 - IA3	-0,57	0,59	0,21	0,794

\* diferença significativa

No grupo 3, ocorreu aumento do IA ao final da isquemia, seguida de redução após a reperfusão para valores iguais aos encontrados, nesse grupo, no início do experimento.

Tabela 14. Análise pareada dos índices apoptóticos no grupo de isquemia intermitente.

Par	Diferença pareada			Valor p
	Média	Desvio padrão	Erro padrão	
IA1 - IA2	-0,71	0,47	0,18	<b>0,007*</b>
IA2 - IA3	0,85	0,79	0,30	<b>0,030*</b>
IA1 - IA3	0,14	0,39	0,15	0,375

\* diferença significativa

A qualificação pelo método de TUNEL para esses resultados obtidos pode ser demonstrada nas figuras abaixo, onde para um mesmo animal se obteve um campo corado pela técnica antes e após a isquemia.

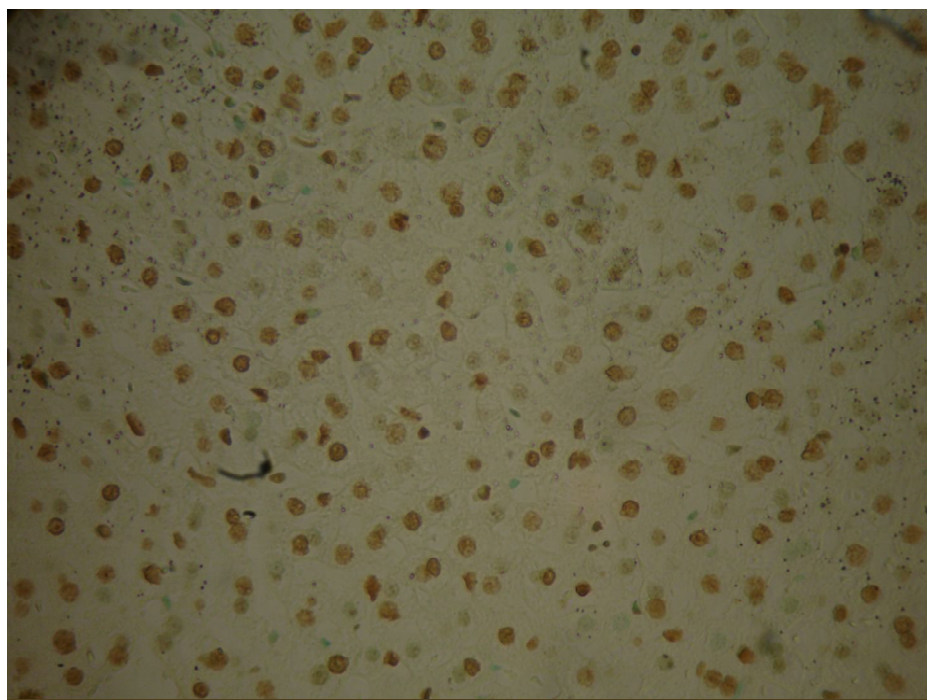


Figura 18. Campo microscópico mostrando coloração fraca por TUNEL antes da isquemia, qualificando o resultado da contagem para obtenção do índice apoptótico (TUNEL, 400x).

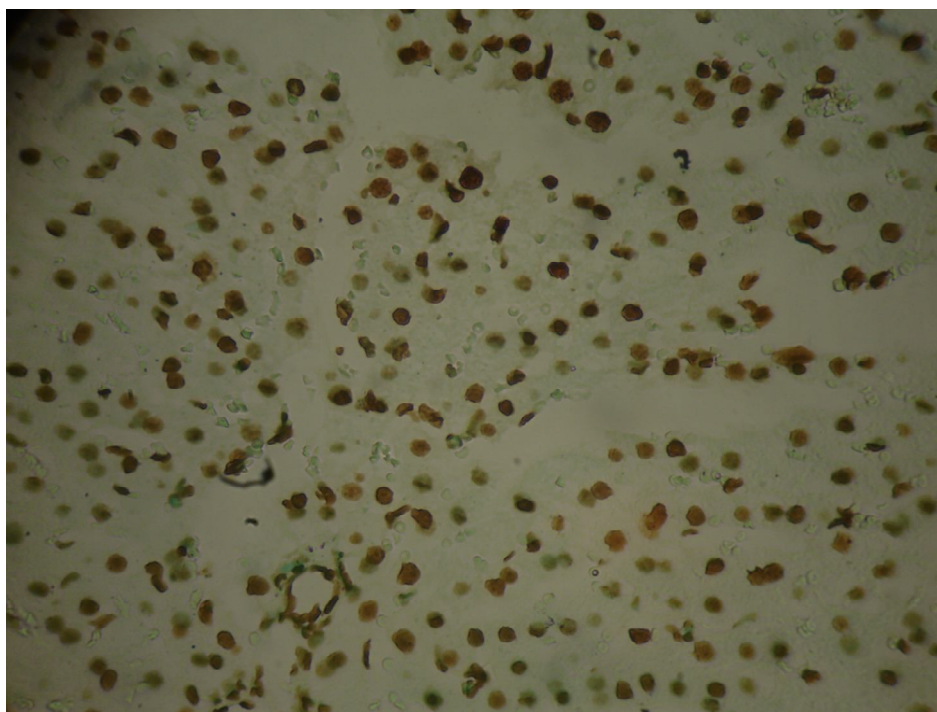


Figura 19. Campo microscópico obtido do mesmo animal após isquemia, com forte coloração nuclear pelo método de TUNEL, evidenciando o aumento da detecção da fragmentação do DNA (TUNEL, 400x).

#### **4.4.3 Análise inter-grupos**

A análise inter-grupos demonstrou que, em T1, os IA dos grupos foram iguais. A isquemia produziu diferença entre os índices de ambos os grupos em relação ao grupo controle. Os resultados estão sumariados na tabela 15, que mostra, também, que não houve diferença de IA entre os grupos e controles após a reperfusão.

Tabela 15. Análise independente dos índices apoptóticos entre os grupos.

Tempos	Grupos	Teste de Levene para igualdade de variâncias		Teste T de student			
		F	P	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	p bicaudal
Tempo 1	Grupo 1	0,76	0,400	7,32	0,32	0,14	0,096
	Grupo 2			7,77	0,48	0,17	
	Grupo 1	2,03	0,184	7,32	0,32	0,14	0,080
	Grupo 3			7,93	0,62	0,24	
	Grupo 2	0,57	0,465	7,77	0,48	0,17	0,592
	Grupo 3			7,93	0,62	0,24	
Tempo 2	Grupo 1	1,42	0,258	7,36	0,48	0,18	<b>0,001*</b>
	Grupo 2			8,78	0,56	0,19	
	Grupo 1	10,80	0,008	7,36	0,48	0,18	<b>0,021*</b>
	Grupo 3			8,64	0,97	0,37	
	Grupo 2	6,73	0,022	8,78	0,56	0,19	0,726
	Grupo 3			8,64	0,97	0,37	
Tempo 3	Grupo 1	0,33	0,576	7,32	0,36	0,16	0,079
	Grupo 2			7,83	0,51	0,18	
	Grupo 1	0,88	0,371	7,32	0,36	0,16	0,162
	Grupo 3			7,79	0,62	0,23	
	Grupo 2	0,20	0,660	7,83	0,51	0,18	0,889
	Grupo 3			7,79	0,62	0,23	

\* diferença significativa

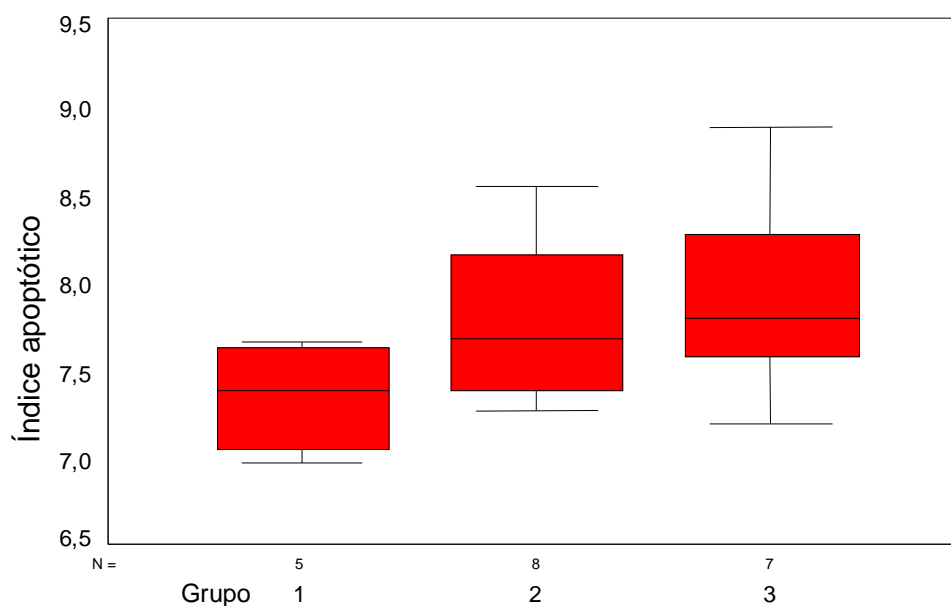


Gráfico 2. *Boxplot* com as médias dos índices apoptóticos no tempo um, para os três grupos experimentais.

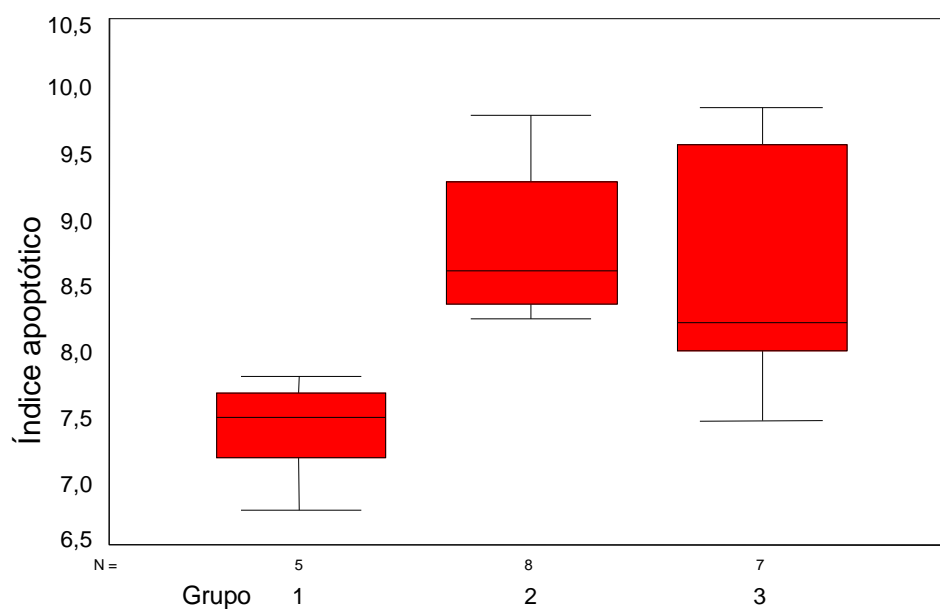


Gráfico 3. *Boxplot* com as médias dos índices apoptóticos no tempo dois, para os três grupos experimentais.

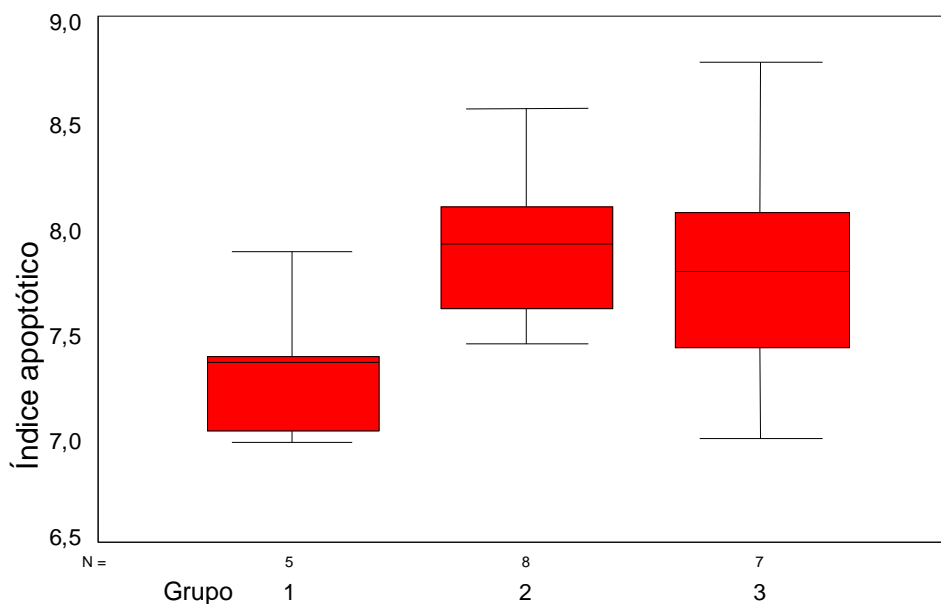


Gráfico 4. *Boxplot* com as médias dos índices apoptóticos no tempo três, para os três grupos experimentais.

#### 4.5 Achados histológicos

Os achados morfométricos após isquemia contínua ou intermitente incluíram infiltrado inflamatório, edema celular, congestão sanguínea sinusoidal, lise celular e vacuolização citoplasmática discretas. Fotomicrografia típica de um campo com os achados descritos está representada na figura 23.

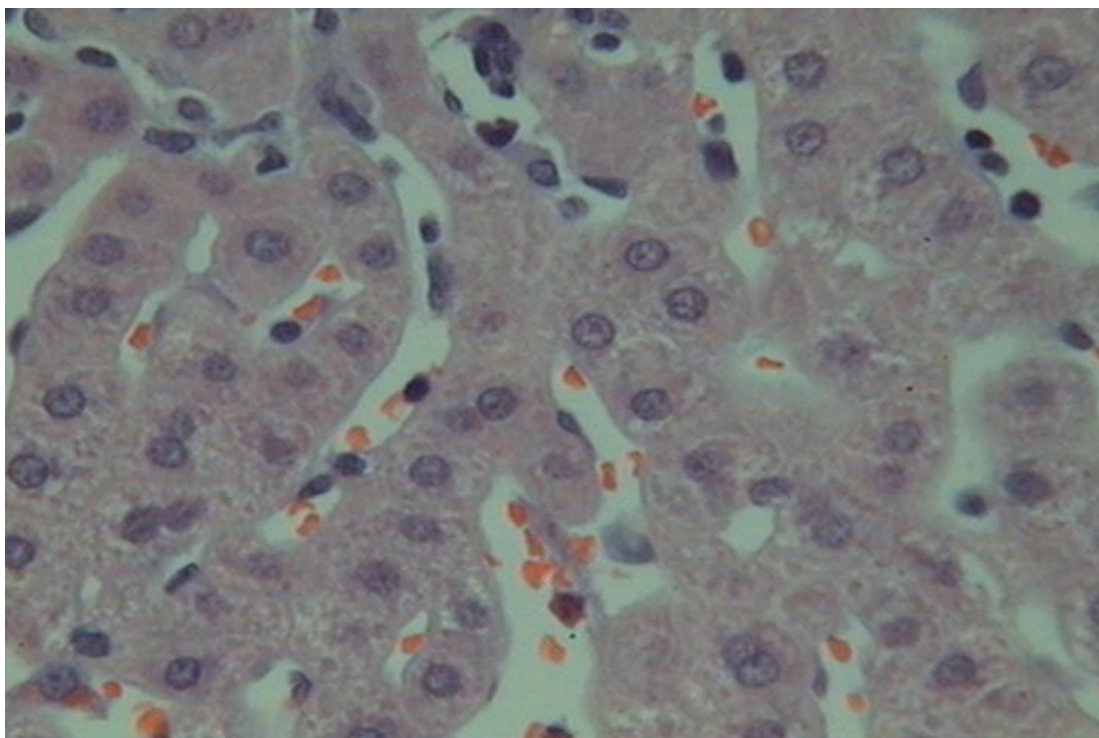


Figura 20. Fotomicrografia mostrando as alterações histológicas encontradas após o período de clampagem contínua (HE, 400x).

## **5 Discussão**

Nesse estudo procurou-se avaliar comparativamente a LIR produzida por isquemia contínua ou intermitente do fígado, em modelo animal, a fim de contribuir com a discussão sobre o melhor método de clampagem do pedículo hepático em hepatectomias.

### **5.1 Estado atual do assunto**

Atualmente, os estudos disponíveis na literatura envolvendo o estudo da LIR hepática em modelos animais são numerosos e interessam diferentes variáveis incluindo modelo animal utilizado, método e tempo de isquemia, isquemia intermitente, pré-condicionamento isquêmico hepático e pré-condicionamento isquêmico remoto (111-114).

É fato conhecido e reproduzido em diversos estudos que a LIR hepática é conseqüente à isquemia normotérmica ou hipotérmica do fígado seguida da reperfusão. A disfunção tissular é secundária ao conjunto desses eventos. A duração da isquemia influi no grau de lesão, apesar de muitas das lesões aparecerem na fase de reperfusão (2-10).

Para o estudo da LIR, é possível a utilização de ferramentas variadas que permitem avaliar o grau de lesão. Elas incluem desde marcadores séricos com diferentes graus de especificidade, passando por marcadores teciduais específicos, expressão imuno-histoquímica de moléculas e estudo histológico do



tecido por variadas técnicas morfológicas, morfométricas e histoquímicas (33, 90, 104, 113, 115-117).

Atualmente, sabe-se que a apoptose é um evento relacionado à isquemia, não só no fígado, mas também em outros órgãos. A qualificação pelo método de TUNEL para avaliação de apoptose por amostragem é frequentemente utilizada. A utilização desse método para detecção de apoptose em células hepáticas e em situações de isquemia de diversos órgãos é consensual na literatura (90, 91, 99, 100, 118-124). O método é utilizado rotineiramente no Laboratório de Apoptose do ICB-UFMG. Esses motivos, entre outros, justificam a sua escolha.

## **5.2 Objetivos**

Esse estudo teve por objetivo identificar, entre dois métodos de clampagem do pedículo hepático (que apresentam diferenças técnicas entre si, com vantagens e desvantagens para ambos) se algum deles é superior ao outro, em relação ao dano hepático provocado. Muitos autores abordaram esse tema, com diferentes resultados (41, 44, 49, 50, 56, 125). Não parece haver consenso sobre a superioridade de um deles.

Em relação a métodos para clampagem do pedículo hepático, foi publicada, em 2007, revisão sistemática pelo Instituto Cochrane, em que as evidências demonstram que a clampagem intermitente é segura, mas não decresce a morbidade do procedimento (46). Assim, não foram encontradas, até o presente momento, evidências clínicas de superioridade de um método sobre o

outro, sendo justificável a realização de novos estudos que busquem identificar essa possível diferença.

### **5.3 Modelo experimental**

A utilização de coelhos, ao contrário de outros roedores, permite o estudo da LIR num modelo de isquemia hepática total (112). Naqueles, só podem ser utilizados modelos com hemi-clampagem (que não refletem as situações que ocorrem na clínica em muitos casos) que adicionam complicações técnicas ao procedimento como a realização de anastomose porto-cava temporária (113, 114, 126). Por esse motivo decidimos utilizar o coelho para o modelo experimental, além de também iniciar a utilização desse animal nessa linha de pesquisa.

Kanoria et al. (112) apresentaram o coelho como modelo experimental para o estudo da LIR mas, em seu estudo, consideraram 25 minutos como o tempo máximo ideal de isquemia contínua. Ao realizarmos o piloto desse estudo observamos que os animais toleravam 60 minutos de isquemia contínua com baixa mortalidade, enquanto a submissão dos mesmos à isquemia intermitente não produzia mortalidade. Os achados histológicos no tocante à lesão hepática dos animais submetidos à isquemia contínua de 60 minutos foram similares aos descritos no estudo de Kanoria et al (112). Outros autores apresentaram diferentes modelos de isquemia intermitente no que diz respeito ao tempo (33, 49, 50, 127).

O número de animais utilizados para o procedimento procurou seguir diretrizes éticas para o uso racional de animais de experimentação preconizadas

pela literatura e pelo CETEA da UFMG (106, 128, 129). Seguindo essas diretrizes, o estudo não demandava a utilização de animais de ambos os gêneros. Assim sendo, apenas coelhos machos foram utilizados.

#### **5.4 Grupos e protocolo de pesquisa**

Os animais foram obtidos em fazenda veterinária que submete os animais solicitados à quarentena de quinze dias. Após seu transporte para o Biotério da Faculdade de Medicina da UFMG, os coelhos foram acomodados em gaiolas com iluminação ambiente com claridade diurna e ausência de luminosidade noturna onde permaneceram por três dias para adaptação. Sabe-se que fatores relacionados ao meio, como a iluminação, podem interferir na adaptação dos animais, bem como a submissão dos mesmos a mudança de ambiente (130).

O número de animais utilizados obedeceu aos princípios de redução preconizados para a experimentação animal, em que se deve utilizar o número mínimo de animais para obter resultado através de teste estatístico sensível que consiga estudar amostras tão pequenas quanto possível.

A homogeneização da amostra foi obtida por meio da distribuição aleatória dos animais nos diferentes grupos experimentais. Para o procedimento cirúrgico, a anestesia foi realizada conforme protocolo disponível no sítio da Web do CETEA da UFMG (107). Do mesmo modo a eutanásia foi realizada seguindo as diretrizes recomendadas nesse sítio (131).

Na realização de hepatectomias o tempo de isquemia é variável chegando a 70 minutos em alguns casos (132-135). Assim sendo, foi optado por submeter

os animais a 60 minutos de procedimento, com isquemia total variando entre 48 minutos (grupo de isquemia intermitente) a 60 minutos (grupo de isquemia contínua) de modo a realizar a comparação em situação similar à encontrada nos procedimentos cirúrgicos realizados em humanos. Esse tempo é seguro – sem aumento de morbi-mortalidade – de acordo com a literatura (33, 115, 136-138). Há modelos que utilizaram até 120 minutos de isquemia (33), com alguma variação (50, 112, 127). Nesse estudo, a diferença entre o tempo de isquemia total no grupo de isquemia contínua com o obtido o grupo de isquemia intermitente (60 *versus* 48 minutos) procurou mimetizar a situação clínica real vivenciada durante os procedimentos cirúrgicos (56).

No presente estudo, os animais submetidos à isquemia intermitente não apresentaram mortalidade pós-operatória. Embora essa observação não fosse objetivo desse estudo, ela está citada na literatura (104, 112).

A definição do modelo de isquemia intermitente de 12 minutos de clampagem seguidos por três de reperfusão baseou-se em dados disponíveis na revisão da bibliografia existente; entre outros autores (33, 49, 50, 104, 139) particularmente Brooks et al (47) demonstraram que, num ciclo de aproximadamente 10 minutos de isquemia, cinco minutos de reperfusão foram suficientes para restabelecimento da oxigenação tecidual intra-hepática. Observamos que embora não dispuséssemos dessa determinação no modelo utilizado por nós, o tempo de reperfusão utilizado pareceu suficiente para a total recuperação do fluxo pelo pedículo e restabelecimento da perfusão do fígado.

Nos demais aspectos técnicos envolvidos, as coletas das amostras de sangue e tecidos não apresentaram problemas e foram realizadas de modo uniforme e sem complicações.

## **5.5 Análise estatística e resultados**

A seleção de um teste estatístico depende do tipo de variável utilizada e do tipo de observação utilizado. As variáveis desse estudo foram quantitativas normais, observadas de forma independente e de forma pareada. As amostras foram submetidas a teste de normalidade e foram consideradas normais. Nesses casos, em ambas as observações, o teste recomendado é o teste  $t$  de Student (140).

A utilização do coeficiente de variância (CV) para determinar o número mínimo de campos representativos foi realizada pelo método já utilizado pela equipe (110). Esse método prevê o encontro da resposta média de observações em um mesmo indivíduo quando as respostas podem apresentar dramática variação, como as células apoptóticas em campos de cortes histológicos de um mesmo indivíduo. Entende-se, nesses casos, que haverá instabilidade das médias relacionada à quantidade de campos observados. Foi possível constatar que, à medida que o número de campos observados aumentava, ocorria redução dessa instabilidade até a obtenção de estabilização, ponto a partir do qual se torna desnecessário aumentar o número de campos observados. Ou seja, com o aumento progressivo do tamanho amostral, os coeficientes de variância devem diminuir, porém até determinado ponto onde se obtém instabilidade aceitável.

Caracteriza-se desse modo, para essa amostra, o número mínimo de campos em que se atinge a menor instabilidade possível em torno da média. É possível demonstrar, também, que a média dos valores obtidos para cada tamanho amostral, a partir da estabilização da curva de variação, tem o mesmo valor que a média obtida com a avaliação de tamanhos amostrais maiores, uma vez que todos são provenientes da mesma população(141). Nesse estudo, essa estabilização ocorreu com 12 campos, o que justificou a utilização dessa quantidade para contagem.

A análise estatística dos dados coletados foi feita com a utilização de análises pareadas para estudo das variações intra-grupo e independentes, para estudo da variação inter-grupos, em acordo com outros estudos similares pesquisados (33). Uma vez que existiam dois tratamentos possíveis e as médias eram relativamente próximas, optou-se, após teste de normalidade na amostra, pela utilização do teste T de Student com o teste de Levene associado apenas para corrigir o resultado de significância de acordo com a presença ou não de igualdade de variância entre os grupos (142). Com isso, foram diminuídas as probabilidades de erro tipo I (encontrar diferença onde ela não existe), que foi considerado mais indesejável do que o tipo II (encontrar equivalência onde ela não existe). A detecção de equivalência entre os métodos de clampagem, caso não existisse, seria melhor que a detecção de superioridade de um método sobre o outro, caso essa não fosse real.

No grupo controle, a análise demonstrou que não houve diferença entre os índices apoptóticos em nenhum momento do protocolo, bem como não houve diferença entre os valores séricos estudados em nenhum exame realizado. A

ligeira tendência da DHL e da AST de apresentar variação entre os T1 e T3 pode ser atribuída ao fato de que esses marcadores são, dentre os estudados, os menos específicos para marcação de lesão hepática e os mais suscetíveis à variação decorrente de stress metabólico relacionado à operação ou eventos de natureza variável, como a lesão muscular (143). Ainda assim tratou-se de tendência e não houve diferença estatística. Em estudo experimental, AST, ALT e DHL aumentaram após isquemia não oclusiva hepatoentérica (clampagem aórtica supracelíaca isolada) e se mantiveram altas mesmo após 180 min de reperfusão (144), mostrando que pode haver alteração desses marcadores não apenas nos casos de isquemia hepática. Glantzounis et al (127) observaram alteração de ALT até mesmo no grupo controle.

A isquemia contínua provocou aumento dos valores séricos da DHL, que continuaram aumentando após a reperfusão, mas sem diferença significativa em relação ao final da isquemia. A média de AST aumentou após a isquemia e caiu tendendo a retornar à média inicial, porém sem significância, ou seja, estatisticamente igual à média ao final da isquemia. A ALT, por sua vez, permaneceu aumentando, sempre com diferença significativa em relação à média do tempo anterior. Uma vez que os níveis de DHL sofrem influência de fatores diversos como a lesão muscular e o stress traumático, isso justifica o comportamento desse marcador associado ao dano relacionado à isquemia hepática. As enzimas AST e ALT, por sua vez, elevaram-se e mantiveram-se alteradas, de modo que a isquemia contínua induziu aumento dessas enzimas que se sustentou por seis horas após a reperfusão. Esse comportamento para AST foi relatado por Van Wagenveld et al (33) e Kang et al (50). No estudo de

Kanoria et al (112) o comportamento foi o mesmo para AST, porém a ALT retornou ao normal após duas horas de reperfusão, diferentemente do que foi observado no estudo de Glantzounis et al (cinco horas) (127).

A isquemia intermitente provocou aumento da fosfatase alcalina, bilirrubina total e AST. Na reperfusão, a DHL (que havia aumentado, mas sem significância, devido à grande variação dos valores e conseqüente desvio padrão) manteve-se elevada e a AST permaneceu alta em relação ao momento inicial. A bilirrubina total caiu para média próxima à encontrada no momento pré-isquemia. A isquemia intermitente provocou alterações diferentes das detectadas na isquemia contínua, conforme observado também por vários autores (33, 50, 56). Em relação à DHL, as alterações foram coincidentes. Elas foram ligeiramente diferentes em termos de significância estatística não por seu comportamento, que foi semelhante, mas pela grande variação entre as unidades amostrais, que levaram a um alto desvio padrão. Este fato impediu a detecção de diferença significativa pelo teste empregado (teste T de Student). Como seria, provavelmente, por qualquer outro, uma vez que esse é o mais sensível para esse tipo de dado, e, principalmente, por que a variação nos valores da DHL foi muito alta.

Não foram observadas diferenças, na análise bioquímica, entre os grupos de isquemia intermitente e controle, o que diverge de alguns estudos onde essa diferença foi encontrada. A dosagem de AST, entretanto, foi diferente após a reperfusão no grupo de isquemia contínua em relação aos outros grupos, o que pode ter sido devido à maior proteção da isquemia intermitente (como sugerido por alguns autores) (49, 50, 56, 139) ou número amostral pequeno. A fosfatase



alcalina elevou-se mais no grupo de isquemia intermitente. Esse fato não está relatado na literatura. Outros estudos mostraram variações importantes nos valores das aminotransferases e da DHL, com grandes variações e erro-padrão correspondente a até 40% da média (33, 47), o que prejudicaria a detecção de diferenças entre grupos fora de uma análise pareada.

Foi observada certa instabilidade das médias sugerindo que as médias pareadas apresentavam melhor correlação entre si do que as médias independentes entre os grupos, ou seja, os grupos alteravam seus valores de modo uniforme em relação aos dados iniciais, mesmo quando esses últimos eram diferentes. Esses achados não encontraram paralelo na literatura pesquisada.

Com relação ao estudo anátomo-patológico, os achados morfométricos após a isquemia incluíram observações encontradas em diversos estudos na literatura (33, 50, 112, 118); entretanto, não foi elaborado ou aplicado qualquer parâmetro de avaliação dessa natureza por não fazer parte do protocolo. Entretanto, é possível realizar esse estudo a partir do material biológico armazenado, no futuro.

A qualificação pelo método de TUNEL para avaliação de apoptose foi realizada por amostragem, de acordo com modelos disponíveis na literatura (121). Nas lâminas avaliadas, a detecção de fragmentação nuclear (coloração forte pela reação de TUNEL) correspondeu ao esperado para os grupos estudados.

O IA constitui método eficiente de quantificar, em valores contínuos, a apoptose no fígado (104, 123, 145, 146). No presente estudo ele não detectou variação no grupo controle durante o experimento. Tal fato era esperado, pois é o achado mais freqüente na literatura (124, 145).

Vários autores demonstraram a relação entre apoptose, necrose e isquemia, relacionando seu aparecimento à LIR em tempos que variaram de 15 minutos a 6 horas, em diferentes modelos animais (8, 120-122). Há resultados variáveis em termos quantitativos em estudos que mostram de 5% a 80% de apoptose após isquemia (122, 124, 147, 148). Estudos isolados, porém, não evidenciaram apoptose (149) ou destacaram a necrose como achado dominante, como o de Meguro et al (8). É possível que, nesse último, isso tenha ocorrido devido ao tempo excessivamente prolongado de isquemia (180 minutos). De modo geral, parece-nos que é consenso na literatura que a apoptose tem relação com o grau de LIR e sua supressão significa menor dano celular. Diante de resultados tão variáveis, justificou-se um novo estudo que contribuísse com informações novas.

Nos grupos de isquemia contínua e intermitente, o IA, avaliado por meio de análise pareada, elevou-se após o período de isquemia e caiu para valores iguais aos iniciais após as seis horas de reperfusão. De forma independente, o IA entre os grupos de isquemia não variou de um grupo para outro, de modo que essa ferramenta, nesse estudo, não foi capaz de determinar diferença entre os métodos de clampagem. Isso não aconteceu com outros dois autores que relataram diferença entre os IA nas isquemias contínuas ou intermitentes (50, 139). Em outro estudo foi citada diferença, porém não quantificada (104).

A utilização de coloração padrão como HE ou similares, sem o uso de reação histoquímica ou imuno-histoquímica para quantificar a apoptose encontra subsídios na literatura (120, 122). Sua facilidade de utilização após treinamento adequado proporciona método de baixo custo, pois reduz a quantidade de

reações histoquímicas necessárias para se obter resultados confiáveis. Isso foi determinante nesse estudo pois tornou factível sua realização em nosso meio.

## **6 Conclusões**

Com base nos resultados encontrados nesse estudo podemos concluir que:

6.1 Em relação ao desenvolvimento de apoptose após clampagem contínua ou intermitente do pedículo hepático, baseando-se nos parâmetros morfométricos utilizados, não existe diferença entre os métodos.

## 7 Referências Bibliográficas (150-153)

1. Filos KS, Kirkilesis I, Spiliopoulou I, Scopa CD, Nikolopoulou V, Kouraklis G, et al. Bacterial translocation, endotoxaemia and apoptosis following Pringle manoeuvre in rats. *Injury*. 2004 Jan;35(1):35-43.
2. Castro e Silva Jr OD, Centurion S, Pacheco EG, Brisotti JL, Oliveira AF, Sasso KD. Aspectos básicos da lesão de isquemia e reperfusão e do pré-condicionamento isquêmico. *Acta Cirurgica Brasileira*. 2002;17:96-100.
3. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am J Pathol*. 1994 Dec;145(6):1421-31.
4. Smith SL, Ciferni ML. Liver transplantation. *Crit Care Nurs Clin North Am*. 1992 Mar;4(1):131-48.
5. Bulkley GB, Oshima A, Bailey RW. Pathophysiology of hepatic ischemia in cardiogenic shock. *Am J Surg*. 1986 Jan;151(1):87-97.
6. Bismuth H, Castaing D, Garden OJ. Major hepatic resection under total vascular exclusion. *Ann Surg*. 1989 Jul;210(1):13-9.
7. Thurman RG, Marzi I, Seitz G, Thies J, Lemasters JJ, Zimmerman F. Hepatic reperfusion injury following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation*. 1988 Oct;46(4):502-6.
8. Meguro M, Katsuramaki T, Kimura H, Isobe M, Nagayama M, Kukita K, et al. Apoptosis and necrosis after warm ischemia-reperfusion injury of the pig liver and their inhibition by ONO-1714. *Transplantation*. 2003 Mar 15;75(5):703-10.
9. Aalto TK, Raivio KO. Nucleotide depletion due to reactive oxygen metabolites in endothelial cells: effects of antioxidants and 3-aminobenzamide. *Pediatr Res*. 1993 Nov;34(5):572-6.
10. Zhang J, Dawson VL, Dawson TM, Snyder SH. Nitric oxide activation of poly(ADP-ribose) synthetase in neurotoxicity. *Science*. 1994 Feb 4;263(5147):687-9.
11. Marzi I, Takei Y, Rucker M, Kawano S, Fusamoto H, Walcher F, et al. Endothelin-1 is involved in hepatic sinusoidal vasoconstriction after ischemia and reperfusion. *Transpl Int*. 1994;7 Suppl 1:S503-6.
12. Jaeschke H, Farhood A, Smith CW. Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo. *Faseb J*. 1990 Dec;4(15):3355-9.

13. Yadav SS, Howell DN, Gao W, Steeber DA, Harland RC, Clavien PA. L-selectin and ICAM-1 mediate reperfusion injury and neutrophil adhesion in the warm ischemic mouse liver. *Am J Physiol.* 1998 Dec;275(6 Pt 1):G1341-52.
14. Cywes R, Packham MA, Tietze L, Sanabria JR, Harvey PR, Phillips MJ, et al. Role of platelets in hepatic allograft preservation injury in the rat. *Hepatology.* 1993 Sep;18(3):635-47.
15. Vollmar B, Richter S, Menger MD. Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol.* 1996 May;270(5 Pt 1):G798-803.
16. Colletti LM, Kunkel SL, Walz A, Burdick MD, Kunkel RG, Wilke CA, et al. The role of cytokine networks in the local liver injury following hepatic ischemia/reperfusion in the rat. *Hepatology.* 1996 Mar;23(3):506-14.
17. Serracino-Inglott F, Habib NA, Mathie RT. Hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg.* 2001 Feb;181(2):160-6.
18. Fong Y, Moldawer LL, Shires GT, Lowry SF. The biologic characteristics of cytokines and their implication in surgical injury. *Surg Gynecol Obstet.* 1990 Apr;170(4):363-78.
19. Collard CD, Gelman S. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology.* 2001 Jun;94(6):1133-8.
20. Borghi-Scoazec G, Scoazec JY, Durand F, Bernuau J, Belghiti J, Feldmann G, et al. Apoptosis after ischemia-reperfusion in human liver allografts. *Liver Transpl Surg.* 1997 Jul;3(4):407-15.
21. Boin IFSF. Atuação do WEB 2086 como inibidor da ação do fator de ativação plaquetária (PAF) em ratos wistar submetidos à isquemia hepática seletiva normotérmica e reperfusão. [Doutorado]. Campinas, SP: UNICAMP; 1997.
22. Bulkley GB. Preconditioning for protection from ischemic injury: discriminating cause from effect from epiphenomenon. *Ann Surg.* 2000 Aug;232(2):163-5.
23. Curti C, Uyemura SA. Estudo da fosforilação oxidativa. In: Castro e Silva Jr Od, Zucoloto S, Beer Jr A, editors. Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia. São Paulo: Robe Editorial; 1998. p. 149-58.
24. Iu S, Harvey PR, Makowka L, Petrunka CN, Ilson RG, Strasberg SM. Markers of allograft viability in the rat. Relationship between transplantation viability and liver function in the isolated perfused liver. *Transplantation.* 1987 Oct;44(4):562-9.

25. Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta*. 1995 Jul 17;1241(2):139-76.
26. Zoratti M, Szabo I, De Marchi U. Mitochondrial permeability transitions: how many doors to the house? *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jan 7;1706(1-2):40-52.
27. Kawada N, Tran-Thi TA, Klein H, Decker K. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur J Biochem*. 1993 Apr 15;213(2):815-23.
28. Kawamura E, Yamanaka N, Okamoto E, Tomoda F, Furukawa K. Response of plasma and tissue endothelin-1 to liver ischemia and its implication in ischemia-reperfusion injury. *Hepatology*. 1995 Apr;21(4):1138-43.
29. Pannen BH, Bauer M, Noldge-Schomburg GF, Zhang JX, Robotham JL, Clemens MG, et al. Regulation of hepatic blood flow during resuscitation from hemorrhagic shock: role of NO and endothelins. *Am J Physiol*. 1997 Jun;272(6 Pt 2):H2736-45.
30. Hur GM, Ryu YS, Yun HY, Jeon BH, Kim YM, Seok JH, et al. Hepatic ischemia/reperfusion in rats induces iNOS gene transcription by activation of NF-kappaB. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999 Aug 11;261(3):917-22.
31. Hardy KJ, Tancheroen S, Shulkes A. Comparison of continuous versus intermittent ischaemia-reperfusion during liver resection in an experimental model. *Br J Surg*. 1995 Jun;82(6):833-6.
32. Noun R, Sauvanet A, Belghiti J. Appraisal of the order of revascularization in human liver grafting: a controlled study. *J Am Coll Surg*. 1997 Jul;185(1):70-3.
33. van Wagenveld BA, van Gulik TM, Gelderblom HC, Scheepers JJ, Bosma A, Endert E, et al. Continuous or intermittent vascular clamping during hemihepatectomy in pigs: hyaluronic acid kinetics in the assessment of early microvascular liver damage. *Eur J Surg*. 2000 Mar;166(3):255-61.
34. Pringle JH. V. Notes on the Arrest of Hepatic Hemorrhage Due to Trauma. *Ann Surg*. 1908 Oct;48(4):541-9.
35. Lortat-Jacob JL. Controlled right hepatic lobectomy in the case of a secondary malignant tumor. *Archives des Maladies de l'Appareil Digestif*. 1952;41:662-7.
36. Cherqui D, Malassagne B, Colau PI, Brunetti F, Rotman N, Fagniez PL. Hepatic vascular exclusion with preservation of the caval flow for liver resections. *Ann Surg*. 1999 Jul;230(1):24-30.

37. Shimada M, Matsumata T, Akazawa K, Kamakura T, Itasaka H, Sugimachi K, et al. Estimation of risk of major complications after hepatic resection. *Am J Surg*. 1994 Apr;167(4):399-403.
38. Nagao T, Inoue S, Goto S, Mizuta T, Omori Y, Kawano N, et al. Hepatic resection for hepatocellular carcinoma. Clinical features and long-term prognosis. *Ann Surg*. 1987 Jan;205(1):33-40.
39. Makuuchi M, Takayama T, Gunven P, Kosuge T, Yamazaki S, Hasegawa H. Restrictive versus liberal blood transfusion policy for hepatectomies in cirrhotic patients. *World J Surg*. 1989 Sep-Oct;13(5):644-8.
40. Abdalla EK, Noun R, Belghiti J. Hepatic vascular occlusion: which technique? *Surg Clin North Am*. 2004 Apr;84(2):563-85.
41. Belghiti J, Marty J, Farges O. Techniques, hemodynamic monitoring, and indications for vascular clamping during liver resections. *J Hepatobiliary Pancreat Surg*. 1998;5(1):69-76.
42. Parra O, Ferraz-Neto B, Afonso RC, Saad-Jr WA, Saad WA. Anatomia cirúrgica do fígado. In: Saad WA, Chaib E, D'Albuquerque LAC, editors. *Atlas de Cirurgia do Fígado*. 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 1998. p. 5-21.
43. Parra O, Saad WA, D'Albuquerque LAC. Anatomia Cirúrgica. In: Silva AO, D'Albuquerque LAC, editors. *Doenças do Fígado*. Rio de Janeiro, RJ: Revinter; 2001. p. 19-30.
44. Belghiti J, Noun R, Zante E, Ballet T, Sauvanet A. Portal triad clamping or hepatic vascular exclusion for major liver resection. A controlled study. *Ann Surg*. 1996 Aug;224(2):155-61.
45. Nuzzo G, Giuliante F, Giovannini I, Vellone M, De Cosmo G, Capelli G. Liver resections with or without pedicle clamping. *Am J Surg*. 2001 Mar;181(3):238-46.
46. Gurusamy KS, Kumar Y, Sharma D, Davidson BR. Methods of vascular occlusion for elective liver resections. *Cochrane Database Syst Rev*. 2007(4):CD006409.
47. Brooks AJ, Hammond JS, Girling K, Beckingham IJ. The effect of hepatic vascular inflow occlusion on liver tissue pH, carbon dioxide, and oxygen partial pressures: defining the optimal clamp/release regime for intermittent portal clamping. *J Surg Res*. 2007 Aug;141(2):247-51.
48. Nieuwenhuijs VB, de Bruijn MT, Schiesser M, Morphett A, Padbury RT, Barritt GJ. Ischemic preconditioning and intermittent ischemia preserve bile flow in a rat model of ischemia/reperfusion injury. *Dig Dis Sci*. 2007 Nov;52(11):3029-37.



49. Petrowsky H, McCormack L, Trujillo M, Selzner M, Jochum W, Clavien PA. A prospective, randomized, controlled trial comparing intermittent portal triad clamping versus ischemic preconditioning with continuous clamping for major liver resection. *Ann Surg.* 2006 Dec;244(6):921-8.
50. Kang KJ, Jang JH, Lim TJ, Kang Y, Park KK, Lee IS, et al. Optimal cycle of intermittent portal triad clamping during liver resection in the murine liver. *Liver Transpl.* 2004 Jun;10(6):794-801.
51. Ozmen MM, Oruc MT, Besler HT, Kulah B, Safali M, Polat A, et al. Comparison of the effects of continuous and intermittent portal triad occlusion (PTO) in rats. *Hepatogastroenterology.* 2003 Nov-Dec;50(54):2127-32.
52. Isozaki H, Adam R, Gigou M, Szekely AM, Shen M, Bismuth H. Experimental study of the protective effect of intermittent hepatic pedicle clamping in the rat. *Br J Surg.* 1992 Apr;79(4):310-3.
53. Delva E, Camus Y, Nordlinger B, Hannoun L, Parc R, Deriaz H, et al. Vascular occlusions for liver resections. Operative management and tolerance to hepatic ischemia: 142 cases. *Ann Surg.* 1989 Feb;209(2):211-8.
54. Huguet C, Gavelli A, Chieco PA, Bona S, Harb J, Joseph JM, et al. Liver ischemia for hepatic resection: where is the limit? *Surgery.* 1992 Mar;111(3):251-9.
55. Dixon E, Vollmer CM, Jr., Bathe OF, Sutherland F. Vascular occlusion to decrease blood loss during hepatic resection. *Am J Surg.* 2005 Jul;190(1):75-86.
56. Belghiti J, Noun R, Malafosse R, Jagot P, Sauvanet A, Pierangeli F, et al. Continuous versus intermittent portal triad clamping for liver resection: a controlled study. *Ann Surg.* 1999 Mar;229(3):369-75.
57. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunology today.* 1993;14(3):126-30.
58. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57.
59. Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 1980 Apr 10;284(5756):555-6.
60. Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol.* 1980;68:251-306.
61. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):770-6.

62. Amarante-Mendes GP, Green DR. The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Biol Res.* 1999 Sep;32(9):1053-61.
63. Vasconcelos AC, Vasconcelos MMA. Apoptose ou morte celular programada – Um novo conceito em Patologia? *Rev Medica de Minas Gerais.* 1996;5(2):103-8.
64. Ellis RE, Yuan JY, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol.* 1991;7:663-98.
65. Miller LJ, Marx J. Apoptosis. *Science.* 1998;281(5381):1305-9.
66. Barinaga M. Is apoptosis key in Alzheimer's Disease? *Science.* 1998;281(5381):1301-4.
67. Kato S, Nakashima K, Inoue M, Tomioka J, Nonaka K, Nishihara T, et al. Human epithelial cell death caused by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *J Med Microbiol.* 2000 Aug;49(8):739-45.
68. Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000 Jul;301(1):5-17.
69. Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Int Rev Exp Pathol.* 1991;32:223-54.
70. Kressel M, Groscurth P. Distinction of apoptotic and necrotic cell death by in situ labelling of fragmented DNA. *Cell Tissue Res.* 1994 Dec;278(3):549-56.
71. Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol.* 1995 Jan;146(1):3-15.
72. Borisenko GG, Matsura T, Liu SX, Tyurin VA, Jianfei J, Serinkan FB, et al. Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis of apoptotic Jurkat cells--existence of a threshold. *Arch Biochem Biophys.* 2003 May 1;413(1):41-52.
73. Doseff AI. Apoptosis: the sculptor of development. *Stem Cells Dev.* 2004 Oct;13(5):473-83.
74. Bursch W, Paffe S, Putz B, Barthel G, Schulte-Hermann R. Determination of the length of the histological stages of apoptosis in normal liver and in altered hepatic foci in rats. *Carcinogenesis.* 1990;11:847-53.
75. Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res.* 2000 Apr 10;256(1):42-9.
76. Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 2001 Nov 15;15(22):2922-33.

77. Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem.* 1999 Sep;264(3):687-701.
78. Loeffler M, Kroemer G. The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita. *Exp Cell Res.* 2000 Apr 10;256(1):19-26.
79. Denault JB, Salvesen GS. Caspases: keys in the ignition of cell death. *Chem Rev.* 2002 Dec;102(12):4489-500.
80. Bratton SB, MacFarlane M, Cain K, Cohen GM. Protein complexes activate distinct caspase cascades in death receptor and stress-induced apoptosis. *Exp Cell Res.* 2000 Apr 10;256(1):27-33.
81. Leist M, Jaattela M. Four deaths and a funeral: from caspases to alternative mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Aug;2(8):589-98.
82. Richardson H, Kumar S. Death to flies: *Drosophila* as a model system to study programmed cell death. *J Immunol Methods.* 2002 Jul 1;265(1-2):21-38.
83. Sartorius U, Schmitz I, Krammer PH. Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *Chembiochem.* 2001 Jan 8;2(1):20-9.
84. Feldmann G. Liver apoptosis. *J Hepatol.* 1997;26 Suppl 2:1-11.
85. Wyllie AH. Apoptosis: cell death under homeostatic control. *Arch Toxicol.* 1987;Suppl(11):3-10.
86. Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner PA, Babior BM, Eugler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 1994(94):1621-8.
87. Kuo PC, Drachenberg CI, de la Torre A, Bartlett ST, Lim JW, Plotkin JS, et al. Apoptosis and hepatic allograft reperfusion injury. *Clin Transplant.* 1998 Jun;12(3):219-23.
88. Sasaki H, Matsuno T, Tanaka N, Orita K. Activation of apoptosis during the reperfusion phase after rat liver ischemia. *Transplant Proc.* 1996 Jun;28(3):1908-9.
89. 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 Jun;27(6):1652-60.
90. Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, Crenesse D, Rostagno P, Maulon L, et al. A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. *Faseb J.* 1999 Feb;13(2):253-61.

91. Kohli V, Selzner M, Madden JF, Bentley RC, Clavien PA. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation*. 1999 Apr 27;67(8):1099-105.
92. Gores GJ, Miyoshi H, Botla R, Aguilar HI, Bronk SF. Induction of the mitochondrial permeability transition as a mechanism of liver injury during cholestasis: a potential role for mitochondrial proteases. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Aug 10;1366(1-2):167-75.
93. Patel T, Roberts LR, Jones BA, Gores GJ. Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease: an overview. *Semin Liver Dis*. 1998;18(2):105-14.
94. Clavien PA. Sinusoidal endothelial cell injury during hepatic preservation and reperfusion. *Hepatology*. 1998 Aug;28(2):281-5.
95. Bradham CA, Qian T, Streetz K, Trautwein C, Brenner DA, Lemasters JJ. The mitochondrial permeability transition is required for tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis and cytochrome c release. *Mol Cell Biol*. 1998 Nov;18(11):6353-64.
96. Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssiere JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *Faseb J*. 1995 Oct;9(13):1277-87.
97. Susin SA, Zamzami N, Castedo M, Hirsch T, Marchetti P, Macho A, et al. Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med*. 1996 Oct 1;184(4):1331-41.
98. Camargo CA, Jr., Madden JF, Gao W, Selvan RS, Clavien PA. Interleukin-6 protects liver against warm ischemia/reperfusion injury and promotes hepatocyte proliferation in the rodent. *Hepatology*. 1997 Dec;26(6):1513-20.
99. Sakon M, Ariyoshi H, Umeshita K, Monden M. Ischemia-reperfusion injury of the liver with special reference to calcium-dependent mechanisms. *Surg Today*. 2002;32(1):1-12.
100. Baier PK, Baumgartner U, Wolff-Vorbeck G, Hempel S, Hopt UT. Hepatocyte proliferation and apoptosis in rat liver after liver injury. *Hepatogastroenterology*. 2006 Sep-Oct;53(71):747-52.
101. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992 Nov;119(3):493-501.
102. Cursio R. Ischemia-reperfusion. *Presse Med*. 2001 Sep 1;30(24 Pt 2):29-30.
103. Wang XH, Wang K, Zhang F, Li XC, Li J, De W, et al. Heme oxygenase-1 alleviates ischemia/reperfusion injury in aged liver. *World J Gastroenterol*. 2005 Feb 7;11(5):690-4.

104. Crenesse D, Laurens M, Gugenheim J, Heurteaux C, Cursio R, Rossi B, et al. Intermittent ischemia reduces warm hypoxia-reoxygenation-induced JNK(1)/SAPK(1) activation and apoptosis in rat hepatocytes. *Hepatology*. 2001 Nov;34(5):972-8.
105. Hoff C. Sounding board. Immoral and moral uses of animals. *N Engl J Med*. 1980 Jan 10;302(2):115-8.
106. Petroianu A. Pesquisa experimental. In: Petroianu A, editor. *Ética, moral e deontologia médicas*. Rio de Janeiro, RJ: Guanabara Koogan; 2000. p. 185-90.
107. Oliveira HP. Protocolos anestésicos comumente utilizados em animais de pequeno porte. (página da internet). 2006 [atualizado em acessado em 2008 19 out]. Disponível em:  
[http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/index.php?option=com\\_content&task=view&id=22&Itemid=35](http://www.ufmg.br/bioetica/cetea/index.php?option=com_content&task=view&id=22&Itemid=35)
108. Luna LG. *Manual of Histology*. 3 ed. New York; 1968.
109. Wilcox D, Dove B, McDavid D, Greer D. *UTHSCSA Image Tool for Windows*. 3.00 ed. Texas: The University of Texas Health Science Center; 2002.
110. Moro L, Vasconcelos AC, Santos FGA, Alves CM, Nunes JES, Sampaio IBM. Determination of the minimal representative number of microscopic fields to quantify apoptosis in canine lymph nodes. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2004;56:408-10.
111. Kanoria S, Jalan R, Davies NA, Seifalian AM, Williams R, Davidson BR. Remote ischaemic preconditioning of the hind limb reduces experimental liver warm ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg*. 2006 Jun;93(6):762-8.
112. Kanoria S, Glantzounis G, Jalan R, Davies NA, Seifalian AM, Williams R, et al. A model to study total hepatic ischemia-reperfusion injury. *Transplant Proc*. 2004 Nov;36(9):2586-9.
113. Yadav SS, Gao W, Harland RC, Clavien PA. A new and simple technique of total hepatic ischemia in the mouse. *Transplantation*. 1998 Jun 15;65(11):1433-6.
114. Sunose Y, Takeyoshi I, Tsutsumi H, Kawata K, Iwazaki S, Matsumoto K, et al. The effect of FR167653 in a canine total hepatic vascular exclusion model. *Hepatogastroenterology*. 2003 Jan-Feb;50(49):161-4.
115. van Wagenveld BA, Reinders ME, van Gulik TM, Gelderblom HC, Frederiks WM, Wanders RJ, et al. Warm flush at 37 degrees C following cold storage attenuates reperfusion injury in preserved rat livers. *Transpl Int*. 1998;11(1):38-45.

116. Cursio R, Filippa N, Miele C, Colosetti P, Auberger P, Van Obberghen E, et al. Fas ligand expression following normothermic liver ischemia-reperfusion. *J Surg Res.* 2005 May 1;125(1):30-6.
117. Crenesse D, Laurens M, Heurteaux C, Cursio R, Saint-Paul MC, Schmid-Alliana A, et al. Rat liver ischemia-reperfusion-induced apoptosis and necrosis are decreased by FK506 pretreatment. *Eur J Pharmacol.* 2003 Jul 25;473(2-3):177-84.
118. Sileri P, Schena S, Morini S, Rastellini C, Pham S, Benedetti E, et al. Pyruvate inhibits hepatic ischemia-reperfusion injury in rats. *Transplantation.* 2001 Jul 15;72(1):27-30.
119. Hochhauser E, Ben-Ari Z, Pappo O, Chepurko Y, Vidne BA. TPEN attenuates hepatic apoptotic ischemia/ reperfusion injury and remote early cardiac dysfunction. *Apoptosis.* 2005 Jan;10(1):53-62.
120. Yokoyama I, Hayashi S, Kobayashi T, Negita M, Namii Y, Katayama A, et al. Hepatocyte apoptosis and cytosolic calcium dynamics in ischemic injury. *Transplant Proc.* 1997 Dec;29(8):3514.
121. Schauer RJ, Gerbes AL, Vonier D, Meissner H, Michl P, Leiderer R, et al. Glutathione protects the rat liver against reperfusion injury after prolonged warm ischemia. *Ann Surg.* 2004 Feb;239(2):220-31.
122. Jawan B, Goto S, Pan TL, Lai CY, Luk HN, Eng HL, et al. The protective mechanism of magnolol, a Chinese herb drug, against warm ischemia-reperfusion injury of rat liver. *J Surg Res.* 2003 Apr;110(2):378-82.
123. Anderson CD, Pierce J, Nicoud I, Belous A, Knox CD, Chari RS. Modulation of mitochondrial calcium management attenuates hepatic warm ischemia-reperfusion injury. *Liver Transpl.* 2005 Jun;11(6):663-8.
124. Jaeschke H. Reperfusion injury after warm ischemia or cold storage of the liver: role of apoptotic cell death. *Transplant Proc.* 2002 Nov;34(7):2656-8.
125. Nieuwenhuijs VB, de Bruijn MT, Schiesser M, Morphett A, Padbury RT, Barritt GJ. Ischemic preconditioning and intermittent ischemia preserve bile flow in a rat model of ischemia reperfusion injury. *Dig Dis Sci.* 2007 May;52(5):1159-67.
126. Sankary HN, Yin DP, Chong AS, Ma LL, Blinder L, Shen JK, et al. The portosystemic shunt protects liver against ischemic reperfusion injury. *Transplantation.* 1999 Oct 15;68(7):958-63.
127. Glantzounis GK, Yang W, Koti RS, Mikhailidis DP, Seifalian AM, Davidson BR. Continuous infusion of N-acetylcysteine reduces liver warm ischaemia-reperfusion injury. *Br J Surg.* 2004 Oct;91(10):1330-9.

128. Petroianu A. Aspectos éticos na pesquisa em animais. *Acta Cir Bras.* 1996 3;11:157-64.
129. Festing MF, Altman DG. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals. *Ilar J.* 2002;43(4):244-58.
130. Kohn DF, Barthold SW. Biology and diseases of rats. In: Fox JG, Cohen BJ, Loew FM, editors. *Laboratory Animal Medicine.* London: Academic Press; 1984. p. 91-9.
131. Oliveira HP, Alves GES, Rezende CMS. Eutanásia em Medicina Veterinária (página da internet). 2003 [atualizado em acessado em 2008 19 out]. Disponível em: <http://www.ufmg.br/coep/eutanasia.pdf>
132. Kim YI, Hwang YJ, Lee JW, Chun BY, Kawano K, Kitano S. 101 hepatectomies under continuous inflow occlusion following simple in-situ liver cooling in patients with chronic liver diseases. *Hepatogastroenterology.* 2004 Jul-Aug;51(58):1093-8.
133. Miller CM, Masetti M, Cautero N, DiBenedetto F, Lauro A, Romano A, et al. Intermittent inflow occlusion in living liver donors: impact on safety and remnant function. *Liver Transpl.* 2004 Feb;10(2):244-7.
134. Nuzzo G, Giuliante F, Vellone M, De Cosmo G, Ardito F, Murazio M, et al. Pedicle clamping with ischemic preconditioning in liver resection. *Liver Transpl.* 2004 Feb;10(2 Suppl 1):S53-7.
135. Tani ai N, Onda M, Tajiri T, Akimaru K, Yoshida H, Mamada Y. Hepatic parenchymal resection using an ultrasonic surgical aspirator with electrosurgical coagulation. *Hepatogastroenterology.* 2002 Nov-Dec;49(48):1649-51.
136. Hannoun L, Borie D, Delva E, Jones D, Vaillant JC, Nordlinger B, et al. Liver resection with normothermic ischaemia exceeding 1 h. *Br J Surg.* 1993 Sep;80(9):1161-5.
137. Huguet C, Gavelli A, Bona S. Hepatic resection with ischemia of the liver exceeding one hour. *J Am Coll Surg.* 1994 May;178(5):454-8.
138. Quan D, Wall WJ. The safety of continuous hepatic inflow occlusion during major liver resection. *Liver Transpl Surg.* 1996 Mar;2(2):99-104.
139. van Wagensveld BA, van Gulik TM, Gelderblom HC, Scheepers JJ, Bosma A, Endert E, et al. Prolonged continuous or intermittent vascular inflow occlusion during hemihepatectomy in pigs. *Ann Surg.* 1999 Mar;229(3):376-84.
140. Iochida LC, Castro AA. Projeto de pesquisa (parte VIII – método estatístico / análise estatística). São Paulo; 2001.

141. Sampaio IBM. As Situações Experimentais e as Respostas Medidas. In: Sampaio IBM, editor. Estatística aplicada à experimentação animal. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia; 2007. p. 7-14.
142. Sampaio IBM. Estatística aplicada à experimentação animal. 3ª ed. Belo Horizonte; 2007.
143. Scheffer JF, González FHD. Enzimologia Clínica em Medicina Veterinária (página da internet). 2003 [atualizado em acessado em 20 oct 2008]. Disponível em:  
[http://www6.ufrgs.br/bioquimica/pesquisa/bioqclin/rev\\_jfss.pdf](http://www6.ufrgs.br/bioquimica/pesquisa/bioqclin/rev_jfss.pdf)
144. Kotake Y, Yamamoto M, Matsumoto M, Morisaki H, Takeda J. Sivelestat, a neutrophil elastase inhibitor, attenuates neutrophil priming after hepatoenteric ischemia in rabbits. *Shock*. 2005 Feb;23(2):156-60.
145. Sasaki H, Matsuno T, Nakagawa K, Matsuoka J, Tanaka N. Superoxide induces hepatocyte apoptosis during the early phase of reperfusion after murine liver ischemia. *Transplant Proc*. 1998 Nov;30(7):2958-9.
146. Iwasaki Y, Tagaya N, Hattori Y, Yamaguchi K, Kubota K. Protective effect of ischemic preconditioning against intermittent warm-ischemia-induced liver injury. *J Surg Res*. 2002 Sep;107(1):82-92.
147. Helling TS, Edwards CA, Helling TS, Jr., Chang CC, Hodges MC, Dhar A, et al. Hepatic apoptotic activity following transient normothermic inflow occlusion and reperfusion in the swine model. *J Surg Res*. 1999 Sep;86(1):70-8.
148. Cursio R, Auberger P, Gugenheim J. Inhibition of apoptosis: a new therapeutic approach to prevent liver ischemia-reperfusion lesions?. *Gastroenterol Clin Biol*. 2000 Jun-Jul;24(6-7):607-8.
149. Altunkan A, Aydin O, Ozer Z, Colak T, Bilgin E, Oral U. Anti-apoptotic effect of succinyl gelatine in a liver ischaemia-reperfusion injury model (Bcl-2, Bax, Caspase 3)? *Pharmacol Res*. 2002 Jun;45(6):485-9.
150. Vancouver system (página da internet). c2008 [atualizado em 26 dez 2008; acessado em 27 dez 2008]. Disponível em:  
[http://en.wikipedia.org/wiki/Vancouver\\_system](http://en.wikipedia.org/wiki/Vancouver_system)
151. Vancouver style (uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals) (página da internet). c2008 [atualizado em 13 abril 2008; acessado em 27 dezembro 2008]. Disponível em:  
<http://www.lib.monash.edu.au/tutorials/citing/vancouver.html>
152. Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication (página da internet).



c2008 [atualizado em outubro 2008; acessado em 26 dezembro 2008].  
Disponível em: <http://www.icmje.org/>

153. University of Queensland Vancouver Referencing Guide (página da internet).  
c2005 [atualizado em junho 2005; acessado em 27 dezembro 2008].  
Disponível em: <http://www.library.uq.edu.au/training/citation/vancouv.pdf>

## **ANEXOS**

## ANEXO A – Certificado de aprovação do CETEA – UFMG



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

### CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 170/2006**, relativo ao projeto intitulado "**Lesão de isquemia-reperusão após clampagem hepática contínua ou intermitente no coelho (*Cryctolagus cunicullus*)**", que tem como responsável **Paulo Roberto Savassi Rocha**, 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 **22/ 11/2006**.

Este certificado expira-se em **22/ 11 / 2011**.

### CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 170/2006**, related to the project entitled "**Ischemia reperfusion damage after continuous or intermitent hepatic occlusion in the rabbit**", under the supervision of **Paulo Roberto Savassi Rocha**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **November 22, 2006**.

This certificate expires in **November 22, 2011**.

Belo Horizonte, 27 de Novembro de 2006.

**Prof. Humberto Pereira Oliveira**  
Presidente 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@ufmg.br](mailto:cetea@ufmg.br)