

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina

MARCELA SOUZA LIMA PAULO

**EFEITO DA OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA
EM RATOS SUBMETIDOS À ESPLENECTOMIA
SUBTOTAL COM PRESERVAÇÃO DO POLO INFERIOR**

Belo Horizonte
2010

MARCELA SOUZA LIMA PAULO

**EFEITO DA OXIGENOTERAPIA HIPERBÁRICA
EM RATOS SUBMETIDOS À ESPLENECTOMIA
SUBTOTAL COM PRESERVAÇÃO DO POLO INFERIOR**

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

Área de concentração: Resposta Inflamatória à Agressão Tecidual.

Linha de pesquisa: Resposta Imunológica na Esplenectomia Parcial.

Orientador: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes.

Coorientador: Prof. Dr. Danilo Nagib Salomão Paulo.

Belo Horizonte
Faculdade de Medicina - UFMG
2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Reitor: Prof. Dr. Clélio Campolina Diniz

Vice-Reitora: Prof^a. Dr^a. Rocksane de Carvalho Norton

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Pró-Reitor de Pesquisa: Prof. Dr. Renato de Lima Santos

FACULDADE DE MEDICINA

Diretor: Prof. Dr. Francisco José Penna

Vice-Diretor: Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Coordenação do Centro de Pós-Graduação: Prof. Dr. Manoel Otávio da Costa Rocha

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

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

Prof. Dr. Alcino Lázaro da Silva

Prof. Dr. Edson Samesina Tatsuo (Coordenador)

Prof. Dr. Marcelo Dias Sanches (Subcoordenador)

Prof. Dr. Marcio Bittar Nehemy

Prof. Dr. Marco Aurélio Lana Peixoto

Prof. Dr. Tarcizo Afonso Nunes

Rep. Discente: Prof. Mestre Denny Fabrício Magalhães Veloso

Aos meus pais, Samir e Maria Luiza,
que por uma vida de dedicação, amor e trabalho,
sempre me possibilitaram realizar sonhos e conquistas.

Aos meus irmãos, Felipe e Fernanda,
exemplos de dignidade, bondade e caráter.

Ao meu esposo, Thiago,
pelo incentivo e compreensão
nos períodos em que me dediquei a este trabalho.
Obrigada pelo seu apoio e carinho.

HOMENAGEM ESPECIAL

Ao Professor Alcino Lázaro da Silva, pesquisador renomado da Faculdade de Medicina da UFMG, obrigada por me orientar no início deste trabalho.

Ao Professor Tarcizo Afonso Nunes, meu orientador, que com sua reconhecida capacidade como pesquisador contribuiu com sugestões na conclusão deste trabalho.

Ao Professor Danilo Nagib Salomão Paulo, que idealizou e dela participou diretamente, demonstrando sua alta capacidade como pesquisador, além do espírito humanístico que o qualifica como um ser humano especial. Meu grande respeito e admiração.

À Doutora Isabel Cristina Andreatta Lemos Paulo, pelo exemplo de persistência, determinação, coragem e competência. Obrigada por me incentivar, junto ao Professor Danilo, à carreira docente e de pesquisa experimental. Agradeço também pelas correções deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que por Sua presença constante em minha vida, sempre me abençoou e me deu força para seguir em busca dos meus sonhos.

À Professora Flávia Imbroisi, coordenadora do Laboratório de Genética Molecular do Centro de Pesquisa da Emescam, pelos materiais cedidos para futuros estudos em Genética Molecular. Obrigada pela amizade e por ter estado sempre disposta a colaborar neste estudo.

Ao Professor Luiz Cálice Cintra, do Laboratório de Patologia da Emescam, e à Luciene Lage, médica patologista do Laboratório de Patologia do Hospital Santa Casa, pela colaboração na análise histológica.

Ao Professor Luiz Renato, do Laboratório de DNA da Polícia Civil, que permitiu o uso de equipamentos indispensáveis à realização deste trabalho e de trabalhos futuros.

Aos acadêmicos do curso de Medicina da Emescam, Marcus Alexandre Novo Brazolino, Jorge Zoghaib, Aline Trugilho Ferrari, Raison Boone e Flávia de Freitas, pela participação e compromisso nos procedimentos experimentais deste trabalho.

À Luciana do Nascimento, funcionária do Centro de Pesquisa da Emescam, pela amizade, atenção e colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Luiz Antônio de Oliveira, auxiliar do Laboratório de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa da Emescam, pelos zelosos cuidados dispensados aos animais e pelo auxílio durante os procedimentos experimentais.

Ao Sidney Aparecido Queiroz Santos, auxiliar da disciplina de Técnica Operatória da Emescam, pela disposição e colaboração no atendimento das solicitações.

Aos técnicos de laboratório da Emescam, Sônia Machado, Rosi de Oliveira, Adilson, Ronildo e Andréia, pela disponibilidade em ajudar a preparar e disponibilizar os materiais necessários a este trabalho.

Aos colegas anestesistas, Marcos Célio e João Florêncio, pelo apoio e amizade durante as idas para Belo Horizonte.

Aos amigos médicos-veterinários, Roberta Miranda, Raquel Benevides e Marcos Vinícius Gumiero, pela amizade e colaboração durante a pesquisa.

À Emescam, por entender a importância da qualificação de seus colaboradores, liberou-me das atividades para que eu pudesse cursar as disciplinas na UFMG. Obrigada também por permitir que os experimentos desta dissertação fossem realizados em suas instalações, dando subsídios suficientes para o sucesso alcançado.

Ao Departamento de Apoio à Pesquisa Clínica e Experimental do Instituto de Desenvolvimento Sustentável e Procedimentos na Área de Saúde (Instituto Solidário), pelo suporte financeiro no mestrado.

À querida Aninha, pelo carinho de mãe.

Às minhas avós, Lourdinha e Eva, pelas orações e amor sem reservas.

À minha família de Belo Horizonte, Tia Zezé, Vanessa, Luiza, Antônio André, Júnia, por terem me recebido com tanto carinho e alegria em sua casa. Não teria tido forças sem o colo de vocês, obrigada por estarem comigo durante toda esta trajetória.

Ao Lucas Múcio Souza Lima Murta, primo querido, por estar comigo em Belo Horizonte nos momentos de descontração.

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

À minha amiga querida e colega de profissão, Fernanda Trindade, por todos os momentos em que estivemos juntas em Belo Horizonte. Obrigada pela força e amizade.

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

Aos animais de laboratório, que com suas vidas proporcionam notória contribuição ao desenvolvimento de novas técnicas e tratamentos médicos, convergindo significativamente para o avanço da ciência e trazendo benefício para nossa saúde.

“Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades e induzir as leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Espertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade.”

Rui Barbosa.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 Esquema mostrando as ligaduras vasculares rentes ao baço e a secção esplênica, com retirada da porção superior e manutenção do polo inferior.....	27
FIGURA 2 Câmara hiperbárica (CHV Vitória Montadora e Distribuidora Ltda. Vitória-ES) com formato cilindro capsular construída com aço carbono.....	28
FIGURA 3 Locais das medidas do comprimento- \underline{C} (1), largura - \underline{L} (2) e espessura - \underline{E} (3) do polo inferior do baço de ratos, com o auxílio de um paquímetro de plástico na época da eutanásia	30
FIGURA 4 Aspecto macroscópico do polo inferior em um animal não tratado com oxigênio hiperbárico - subgrupo Ant45 (1) e em um animal tratado com oxigênio hiperbárico - subgrupo Bt45 (2)	38
FIGURA 5 Fotomicrografia da porção superior do baço (PSc).....	39
FIGURA 6 Fotomicrografia do polo inferior do baço - Subgrupo Ant15.....	40
FIGURA 7 Fotomicrografia do polo inferior do baço - Subgrupo Ant45.....	41
FIGURA 8 Fotomicrografia do polo inferior do baço - Subgrupo Bt15.....	42
FIGURA 9 Fotomicrografia do polo inferior do baço - Subgrupo Bt45.....	43

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Peso (g) dos ratos dos grupos tratados e não tratados com oxigênio hiperbárico, no pré-operatório, no 10º dia e no pós-operatório, submetidos à esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior (ESTPI).....	34
TABELA 2	Peso final do polo inferior do baço em ratos tratados e não tratados com oxigênio hiperbárico no pós-operatório mediato (15º dia) e no pós-operatório tardio (45º dia), submetidos à esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior (ESTPI).....	35
TABELA 3	Comprimento do polo inferior do baço em ratos tratados e não tratados com oxigênio hiperbárico no pré e pós-operatório mediato (15º dia) e no pré e pós-operatório tardio (45º dia) submetidos à esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior (ESTPI).....	36
TABELA 4	Largura do polo inferior do baço em ratos tratados ou não com oxigênio hiperbárico no pré e pós-operatório mediato (15º dia) e no pré e pós-operatório tardio (45º dia) submetidos à esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior (ESTPI).....	36
TABELA 5	Espessura do polo inferior do baço em ratos tratados e não tratados com oxigênio hiperbárico no pré e pós-operatório mediato (15º dia) e no pré e pós-operatório tardio (45º dia) submetidos à esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior (ESTPI).....	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATP	Adenosina trifosfato
BPA	Biotério de Produção Animal
CETEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CO ₂	Gás carbônico
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
Emescam	Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória
ESTPI	Esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior
g	gramas
IHQ	Imunoistoquímica
Kg	Quilogramas
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LEA	Laboratório de Experimentação Animal
MA	Média aritmética
mg	Miligramas
mL	Mililitros
n	Número de animais
nt	Não tratado
O ₂	Oxigênio
OHB	Oxigenoterapia hiperbárica ou oxigênio hiperbárico
pH	Potencial de Hidrogênio
PI	Polo inferior
PO ₂	Pressão parcial de oxigênio
PSc	Porção superior controle
SBCAL	Sociedade Brasileira em Ciência de Animais de Laboratório
t	Tratado
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

RESUMO

Objetivos: avaliar o efeito da oxigenoterapia hiperbárica em ratos submetidos à esplenectomia subtotal quanto aos seguintes aspectos: sobrevida e peso dos animais, viabilidade e crescimento do polo inferior. **Método:** 40 ratos machos *Wistar* pesando entre 274 e 313 g (média aritmética $294,15 \pm 10,33$ g) foram submetidos à esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior e distribuídos em dois grupos: grupo A (n=20) - ratos não tratados com oxigênio hiperbárico; grupo B (n=20) - ratos tratados com oxigênio hiperbárico. Os grupos A e B foram divididos em dois subgrupos de 10 animais cada, de acordo com a época de eutanásia: subgrupo 15 dias, subgrupo 45 dias. No início do experimento foram medidos comprimento, largura e espessura do polo inferior do baço. No final do experimento (15^o e 45^o dias) o polo inferior foi novamente medido, pesado e enviado para análise microscópica direcionada para a celularidade e vascularização. **Resultados:** todos os animais sobreviveram. Houve aumento de peso dos animais de todos os subgrupos do início para o final do experimento. Nos animais dos subgrupos B15 e B45, no entanto, foi constatada a diminuição do peso durante o período de 10 dias, correspondente ao tratamento com oxigênio hiperbárico. A viabilidade do polo inferior foi mais evidente nos animais tratados que nos não tratados com oxigênio hiperbárico no 15^o dia, porém não diferiu no 45^o dia. O comprimento, largura e espessura do polo inferior não se alteraram no 15^o dia em nenhum dos grupos. No 45^o dia pós-operatório, nos animais não tratados, houve crescimento do comprimento do polo inferior ($p < 0,01$); e nos animais tratados ocorreu crescimento da espessura do referido polo ($p < 0,05$). A análise histológica mostrou proliferação celular mais intensa nos grupos A e B do que na porção superior controle. O aumento celular e vascular nos animais tratados com oxigênio hiperbárico foi mais significativo do que nos animais não tratados. **Conclusões:** a oxigenoterapia hiperbárica causou diminuição do peso, mas não interferiu na sobrevida dos animais. Melhorou a viabilidade do polo inferior do baço, mas não interferiu no seu crescimento.

Palavras-chave: Esplenectomia/efeitos adversos. Esplenectomia/métodos. Oxigenação hiperbárica. Experimentação animal.

ABSTRACT

Purpose: Assess the effect of the hyperbaric oxygen therapy in rats submitted to total splenectomy as for the following aspects: survival rate and weight of the animals, feasibility and growing of the lower pole. **Methods:** Forty male Wistar rats, weighing between 274 g e 313g (MA 294,15g \pm 10,33g), underwent total splenectomy preserving the lower pole and divided into two groups: group A (n=20) – animals not treated with (nt) with hyperbaric oxygen; group B (n=20) - rats treated with hyperbaric oxygen. Groups A and B were subdivided into two groups of 10 animals each, according to the time the euthanasia took place: subgroup 15 days, subgroup 45 days. At the beginning of the experiment, the length, width and thickness of the lower pole of the spleen were measured. At the end of the experiment (15th and 45th days) the lower pole was once again measured, weighed and sent to morphological studies. **Result:** All the animals survived. There has been an increase in the weight of the animals of all subgroups from the beginning to the end of the experiment. However, there has been a decrease in the weight of the animals from the subgroup Bt15 and Bt45 within the period of ten days corresponding to the treatment with hyperbaric oxygen . The feasibility of the lower pole was more evident in the treated animals rather than in the animals not treated with hyperbaric oxygen on the 15th day, however it did not differ on the 45th day. The length, width and thickness of the lower pole remained unchanged on the 15th day in neither of the groups. On the 45th day of the postoperative period, there has been a growth in the lower pole ($p < 0,01$) in the non-treated, and there has been a growth in the thickness of the mentioned pole ($p < 0,05$) in the treated animals. The histological analysis showed a more intense cell proliferation in the groups A and B compared to the upper control-part of the spleen. The vascular and cellular increase in the animals treated with hyperbaric oxygen therapy was greater than in the non-treated animals. **Conclusion:** The hyperbaric oxygen therapy is responsible for the weight loss, but it does not affect the survival rate of the animals. It improves the feasibility of the lower pole of the spleen, in spite of not interfering in its growth.

Keys words: Esplenectomy/adverse effects. Esplenectomy/methods. Oxygen inhalation therapy. Animal experimentation.

SUMÁRIO¹

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 OBJETIVOS.....	18
3 RELEVÂNCIA.....	19
4 REVISÃO DA LITERATURA.....	20
4.1 Esplenectomia parcial.....	20
4.2 Oxigenoterapia hiperbárica.....	21
5 MÉTODO.....	24
5.1 Estudo piloto.....	24
5.2 Características da amostra e cuidados dispensados aos animais.....	24
5.3 Constituição dos grupos de animais.....	25
5.4 Anestesia e esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior.....	26
5.5 Pós-operatório.....	27
5.6 Oxigenoterapia hiperbárica.....	28
5.7 Eutanásia dos animais e extirpação do tecido esplênico remanescente...	28
5.8 Medida e pesagem do polo inferior do baço.....	29
5.9 Exame macroscópico.....	30
5.10 Exame microscópico.....	31
5.11 Variáveis estudadas e testes estatísticos.....	31
6 RESULTADOS.....	33
6.1 Exame da cavidade abdominal.....	33
6.2 Sobrevida dos animais no pós-operatório.....	33
6.3 Peso dos animais.....	33
6.4 Peso do polo inferior remanescente.....	34
6.5 Medida do polo inferior remanescente.....	35
6.6 Avaliação macroscópica do polo inferior.....	37
6.7 Avaliação microscópica do polo inferior.....	38

¹ Este trabalho foi revisado de acordo com as novas regras ortográficas.

7 DISCUSSÃO.....	44
8 CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS.....	49
ANEXO E APÊNDICE.....	56

1 INTRODUÇÃO

O baço, órgão do sistema mononuclear fagocitário¹, foi considerado durante muito tempo não-essencial à vida e, portanto, acreditava-se que sua extirpação devido a trauma ou outras doenças não provocaria dano mais sério ao paciente²⁻⁵. Em 1952, King e Shumacker Jr. constataram a associação entre a esplenectomia total e a ocorrência de sepse em crianças⁶. Desde então, os riscos de infecção pós-esplenectomia têm sido reconhecidos em crianças e adultos, principalmente nos dois primeiros anos após a cirurgia^{7,8}. As complicações infecciosas após a esplenectomia foram também observadas em animais de experimentação⁹⁻¹². Têm sido também relatadas alterações no metabolismo lipídico em seres humanos¹³⁻¹⁵ e em animais de laboratório¹⁶⁻²¹, que podem causar aterosclerose¹⁶. O baço, provavelmente, apresenta funções ainda desconhecidas. Observada a importância desse órgão, sua preservação total ou parcial passou a ser realizada de forma mais frequente por meio de esplenorrafias⁵, oclusões vasculares²²⁻²⁶, esplenectomias parciais²⁷⁻³⁰ e dos autoimplantes esplênicos³¹⁻³³. Dessas operações, a mais recentemente descrita é a esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior (ESTPI)³⁰. Nesta técnica, o suprimento sanguíneo é mantido por meio dos vasos do ligamento gastroesplênico. Essa operação foi realizada em cães³⁰ e em ratos³⁴ e a avaliação do polo inferior, no pós-operatório mediato, mostrou alterações da viabilidade do tecido remanescente, em alguns casos acompanhada de alterações da função lipídica^{30,35}. No pós-operatório tardio observou-se hiperplasia folicular acentuada e aumento da população celular do polo inferior em cães no 60º dia³⁰. Paulo *et al*, em 2008, observaram crescimento do desse remanescente no 80º dia³⁷. A ESTPI, em modelo diferente ao que foi descrito, mostrou que o padrão histológico deste polo torna-se semelhante ao tecido esplênico normal em 45 dias. Não se sabe, no entanto, se essas alterações podem sofrer influência de algum fator. Estudo recente mostrou que no 11º dia de pós-operatório os animais tratados com oxigênio hiperbárico (OHB) apresentaram melhor função lipídica e viabilidade do polo inferior do baço em comparação com os não tratados³⁸. No 70º

dia de pós-operatório, entretanto, não se observou influência da OHB na viabilidade do referido polo³⁸.

Em estudos experimentais verificou-se que a oxigenoterapia hiperbárica tem efeito angiogênico^{39,40}, estimula a circulação colateral⁴¹, atenua os efeitos deletérios sobre o fígado e o baço de ratos submetidos à ligadura das veias hepáticas com aumento da sobrevida⁴² e melhora o resultado de transplantes das ilhotas pancreáticas⁴³. Diante disso, questionou-se se esse recurso terapêutico poderia de fato interferir na viabilidade e, conseqüentemente, no crescimento do polo inferior remanescente da esplenectomia subtotal, no pós-operatório. Assim, poder-se-ia recuperar parcial ou totalmente as funções do baço, evitando-se as complicações decorrentes da disfunção esplênica.

Outro aspecto relevante a ser estudado diz respeito à análise dos efeitos da OHB na evolução e sobrevida dos animais. Em trabalho anterior⁴⁴, os ratos submetidos à ESTPI e tratados com oxigênio hiperbárico durante 10 dias apresentaram significativa queda de peso no 11º dia pós-operatório. Além disso, esses ratos sobreviveram menos que aqueles não tratados, porém de forma não-significante. Diante dessas questões, permanece a dúvida se a OHB poderia interferir no peso e na sobrevida dos animais.

2 OBJETIVOS

Avaliar o efeito da oxigenoterapia hiperbárica em ratos submetidos à esplenectomia subtotal quanto aos seguintes aspectos:

- Peso e sobrevivência dos animais.
- Viabilidade e crescimento do polo inferior do baço.

3 RELEVÂNCIA

O propósito da esplenectomia subtotal é preservar tecido esplênico suficiente para manter as funções do baço. É possível que esse remanescente cresça com o passar do tempo. Isso pode ser benéfico, pois irá melhorar a função esplênica. A oxigenoterapia hiperbárica (OHB) após a esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior pode melhorar a viabilidade do polo inferior ou mesmo acelerar o crescimento, pois ela estimula a angiogênese. Caso isso ocorra, essa modalidade terapêutica pode ser utilizada visando, além do crescimento do polo inferior do baço, manter as importantes funções desse órgão ou, pelo menos, parte delas. Assim, evitam-se as complicações decorrentes da disfunção esplênica.

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 Esplenectomia parcial

William Mayo, em 1910, relatou três operações conservadoras do baço: uma por traumatismo, outra por torção do pedículo esplênico com necrose parcial do baço e a terceira para tratar abscesso de polo esplênico⁴⁵.

Campos Christo, em 1959²⁷, introduziu a esplenectomia parcial na prática cirúrgica. Os estudos sobre a segmentação vascular do baço e, principalmente, os trabalhos de Zappalá⁴⁶ e Neder⁴⁷ deram suporte a Campos Christo para desenvolver a técnica da esplenectomia parcial regrada. De acordo com esse cirurgião, seguindo a orientação da arquitetura vascular proveniente do pedículo esplênico, qualquer segmento do baço pode ser extirpado, preservando-se o restante do órgão. Depois desse trabalho, a cirurgia conservadora do baço recebeu expressivo impulso e suas indicações vêm sendo cada vez mais ampliadas.

Petroianu, em 1983²⁹, relatou que após esplenectomia subtotal o polo superior do baço permanece viável, suprido pelos vasos gastroesplênicos. Esse mesmo fenômeno foi observado em cães, nos quais os vasos esplenogástricos mantêm a drenagem e irrigação do polo superior^{48,49}. Paulo *et al.*³⁰ mostraram a exequibilidade da ESTPI em cães, mesmo com a ligadura dos vasos esplênicos principais, e esse remanescente manteve-se macroscopicamente viável em 86,6% dos casos. Estudo sobre a função desse polo no metabolismo lipídico no período inicial descreveu elevações dos níveis de colesterol e da fração *low density lipoprotein* (LDL)¹⁸, porém tardiamente houve normalização dos níveis de lipídios¹⁸. Essa função, em ratos, ficou inalterada após 90 dias⁵⁰. A extirpação parcial do baço foi também realizada por via laparoscópica por Poulin *et al.*, em 1995⁵¹. A esplenectomia subtotal laparoscópica no cão, com preservação do polo superior suprido pelos vasos esplenogástricos, foi realizada por Berindoague Neto, em 2002. O remanescente esplênico preservou sua estrutura anatômica e histológica⁵².

4.2 Oxigenoterapia hiperbárica

A oxigenoterapia hiperbárica (OHB) é um método terapêutico no qual o indivíduo é submetido à inalação de oxigênio (O_2) puro sob pressão em câmaras hiperbáricas, habitualmente entre duas e três atmosferas⁵³⁻⁵⁷. As câmaras são ambientes fechados e resistentes à pressão, capazes de acomodar um indivíduo (monopaciente) ou vários (multipaciente). O efeito primário da OHB consiste em aumentar a pressão parcial de oxigênio (PO_2) no plasma.

As bases fisiopatológicas do tratamento hiperbárico foram relatadas pela primeira vez por Paul Bert, em 1878, enfatizando a intoxicação pelo oxigênio sob pressão no organismo animal⁵⁸. Por sua vez, Haldane, em 1895, a partir de experimentos com animais, salientou o efeito protetor do oxigênio hiperbárico no tratamento da intoxicação pelo monóxido de carbono⁵⁸. Apesar dos achados sobre a utilização de oxigênio puro em câmaras hiperbáricas desde 1662, essa terapia somente foi aceita no Brasil a partir de 1930 e restringia-se, praticamente, ao tratamento de casos de doenças relacionadas à descompressão brusca ocorrida com mergulhadores⁵⁹.

Após o estabelecimento de normas de segurança referentes ao procedimento, a OHB passou a ser empregada no tratamento de diversas doenças⁶⁰. No Brasil, o Conselho Federal de Medicina, mediante a Resolução 1.457/95, aprovou as seguintes indicações para a oxigenoterapia hiperbárica^{61,62}: embolia gasosa; doença descompressiva; embolia traumática pelo ar; envenenamento por monóxido de carbono ou inalação de fumaça; envenenamento por cianeto ou derivados cianídricos; gangrena gasosa; síndrome de Fournier; outras infecções necrotizantes de partes moles: celulites, fasciites, miosites; isquemias traumáticas agudas: lesão por esmagamento, síndrome compartimental e reimplante de extremidade amputada; vasculites agudas de etiologia alérgica, medicamentosa ou por toxinas biológicas (aracnídeos, ofídios e insetos); queimaduras térmicas ou elétricas; lesões refratárias: úlceras de pele, pé-diabético, escaras de decúbito, úlceras por vasculites autoimunes e deiscências de sutura; lesões por radiação (radiodermite, osteorradioneclrose e lesões actínicas de mucosas); retalhos ou enxertos comprometidos ou de risco; osteomielites; anemia aguda, nos casos de impossibilidade de transfusão sanguínea.

A maioria dos efeitos colaterais e complicações oriundos da OHB é decorrente da variação de pressão e/ou toxicidade do oxigênio⁶³.

A OHB apresenta as seguintes contraindicações:

- Absolutas: uso de medicamentos como Doxorubicin, Dissulfiram e Cis-Platinum, pneumotórax não-tratado e gravidez⁶⁴.
- Relativas: infecções das vias aéreas superiores, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) com retenção de CO₂, hipertermia, história de pneumotórax espontâneo, cirurgia prévia em ouvido, esferocitose congênita, infecção viral – fase aguda. Todas essas merecem avaliação antes da realização da OHB.

Em caráter experimental, demonstrou-se que a OHB atua benéficamente em processos inflamatórios tais como: pancreatite⁶⁵, colite^{66,67}, hepatite crônica⁶⁸ e aterosclerose⁶⁹. Em modelos de isquemia e reperfusão de músculos de ratos, confirmou-se que esse tratamento preserva os níveis de creatinafosfato, adenosina trifosfato (ATP), glicogênio e glicose, além de reduzir o edema da parede vascular⁷⁰. A OHB foi utilizada no tratamento da peritonite produzida por perfuração cecal com diâmetro entre 3 e 4 mm⁷¹, na peritonite meconial⁷² e na peritonite por Zimosan®⁷³, com bons resultados. Além disso, quando utilizada antes da isquemia (pré-tratamento), atenua a lesão de isquemia e reperfusão do intestino⁷⁴, fígado⁷⁵ e coração⁷⁶.

Estudo recente demonstrou que a OHB estimula a regeneração hepática em 24 a 48 horas após hepatectomia de 70% em ratos⁷⁷. Os efeitos da OHB no tecido hepático ocorrem sem danos teciduais e protegem a mitocôndria após 48 horas⁷⁷. A OHB em ratos submetidos à ligadura das veias hepáticas atenuou os efeitos deletérios e precoces sobre o fígado e o baço e reduziu a incidência de mortes no pós-operatório⁴².

Em ratos submetidos à ligadura simultânea da artéria e veias esplênicas, a OHB reduziu significativamente a frequência de infartos, mas não alterou o percentual de massa viável e acelerou o processo de cicatrização com aumento da proliferação de fibroblastos e da neoformação vascular⁷⁸.

Em ratos submetidos à preservação do polo inferior após esplenectomia subtotal e ao autoimplante esplênico, a OHB melhorou a função lipídica e a viabilidade do tecido esplênico no 11º dia pós-operatório³⁸. A OHB, no 70º dia

pós-operatório, melhorou a função lipídica e a viabilidade dos animais com autoimplante. Nos animais submetidos à esplenectomia subtotal, a OHB não alterou a viabilidade do polo inferior nesse período³⁸.

5 MÉTODO

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Experimentação Animal (LEA) do Centro de Pesquisa da Escola Superior de Ciências da Santa Casa de Misericórdia de Vitória - ES (Emescam). A manipulação dos animais seguiu os “Princípios Éticos da Experimentação Animal” descritos pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA). O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (nº 004/08 - CETEA) da Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Brasil (ANEXO A).

5.1 Estudo piloto

Nessa fase da pesquisa foram utilizados cinco ratos machos da linhagem *Wistar* para treinamento da técnica anestésica, dos procedimentos cirúrgicos e do protocolo da oxigenoterapia hiperbárica. O estudo piloto foi bem-sucedido, o que permitiu o início do estudo definitivo.

5.2 Características da amostra e cuidados dispensados aos animais

Para a realização da esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior (ESTPI), foram utilizados 40 ratos machos da linhagem *Wistar*, pesando entre 274 e 313 g ($294,15 \pm 10,33$ g), provenientes do Biotério de Produção Animal (BPA) do Centro de Pesquisa da Emescam. Os animais permaneceram em gaiolas apropriadas e devidamente identificadas e mantidas em gabinetes Biotério STD 5 (Grupo *Vidy* - São Paulo, Brasil) em condições adequadas à espécie em estudo. Trata-se de gabinetes climatizados com controle de temperatura (20 a 22°C), ventilação e luminosidade (12 horas claro e 12 horas escuro). Receberam ração própria para rato (Nuvilab CR-1 autoclavável - Nuvital®) e água *ad libitum* em todas as fases do experimento.

5.3 Constituição dos grupos de animais

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em dois grupos de acordo com o tratamento ou não com oxigênio hiperbárico. Cada grupo foi dividido em dois subgrupos de acordo com a época em que foram eutanasiados, conforme esquema a seguir:

- Grupo A (n=20) - animais submetidos à ESTPI, não tratados (nt) com oxigênio hiperbárico.
 - a) Subgrupo A15 (n=10) - animais não tratados com oxigênio hiperbárico e eutanasiados no 15^o dia.
 - b) Subgrupo A45 (n=10) - animais não tratados com oxigênio hiperbárico e eutanasiados no 45^o dia.
- Grupo B (n=20) - animais submetidos à ESTPI, tratados (t) com oxigênio hiperbárico.
 - a) Subgrupo B15 (n=10) - animais tratados com oxigênio hiperbárico e eutanasiados no 15^o dia.
 - b) Subgrupo B45 (n=10) - animais tratados com oxigênio hiperbárico e eutanasiados no 45^o dia.

A randomização foi feita 1:1 da seguinte maneira:

- Foram escritos 40 números com letras (A15-n=10; A45-n=10; B15-n=10; B45-n=10) em um pedaço de papel e colocados em um envelope opaco;
- um auxiliar de laboratório misturava os papéis, retirava e abria um a um para identificação do subgrupo a que pertencia.

No final desse processo os animais de cada subgrupo foram colocados em gaiolas devidamente identificadas (quatro animais por gaiola). O cirurgião que executou o procedimento desconhecia o grupo ao qual o animal pertencia. Durante todo o experimento utilizou-se ficha de anotação para acompanhamento individual dos animais (APÊNDICE A).

5.4 Anestesia e esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior

Após jejum alimentar de seis horas⁷⁹, os animais foram pesados (balança eletrônica Filizola[®] modelo MF-6 – sensibilidade de 1 g) e anestesiados com cloridrato de cetamina (Vetaset[®], Fort Dodge – Iowa, USA) na dose de 50 mg/Kg de peso do animal associado a cloridrato de xilazina (Kensol[®], König – Avellaneda, Argentina) na dose de 5 mg/Kg de peso aplicados via intraperitoneal. Em seguida, os ratos foram imobilizados em mesa cirúrgica, realizada a tricotomia da parede abdominal e torácica e antissepsia da parede abdominal com solução alcoólica de polivinilpirrolidona-iodo a 10%.

O procedimento cirúrgico consistiu em:

- Incisão longitudinal e mediana da pele e tela subcutânea com aproximadamente 2,5 cm de comprimento, que se iniciou 0,5 cm abaixo do processo xifoide;
- abertura da linha alba e peritônio;
- exploração da cavidade abdominal;
- mobilização do baço até a superfície da cavidade abdominal;
- ligadura e secção dos vasos que irrigavam a porção superior e média do baço, rente à superfície esplênica, com mononylon 6.0 (Shalon[®], Shalon Fios Cirúrgicos LTDA - Goiás, Brasil);
- secção do baço abaixo dos vasos laqueados. O polo inferior foi mantido irrigado por vasos do ligamento gastroesplênico de acordo com a técnica descrita por Paulo *et al.*, 1999³⁰ (FIG. 1);
- a área cruenta do polo inferior do baço não foi suturada;
- medição do polo inferior do baço na sua parte central, quanto ao comprimento, largura e espessura, empregando-se paquímetro de plástico (FIG. 3);
- laparorráfia por meio de sutura contínua do peritônio e o plano músculo-aponeurótico em conjunto e da pele empregando-se mononylon 6.0 (Shalon[®], Shalon Fios Cirúrgicos LTDA - Goiás, Brasil).

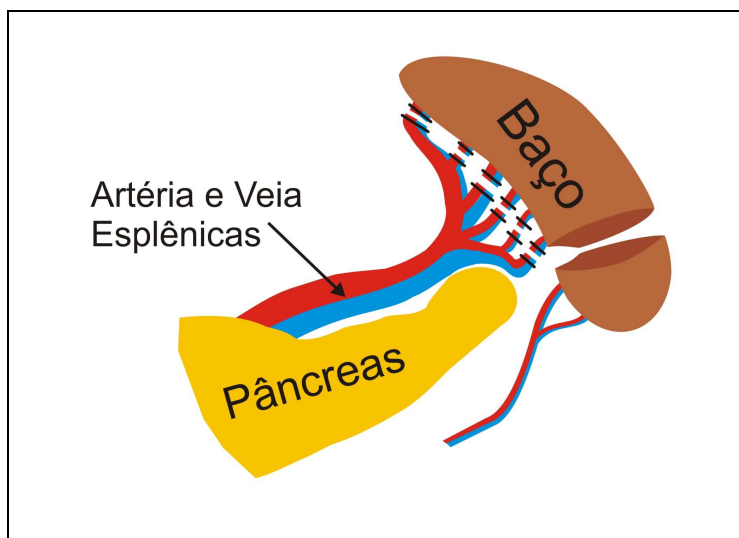


FIGURA 1 - Esquema mostrando as ligaduras vasculares rentes ao baço e a secção esplênica, com retirada da porção superior e manutenção do polo inferior.

Fonte: cedida pela Dra. Isabel Cristina Andreatta Lemos Paulo.

Ao final da cirurgia foram administrados 5 mL de solução salina 0,9% via subcutânea a cada 24 horas por dois dias, com a finalidade de reposição hidroeletrólítica⁷⁹.

A porção superior do baço extirpada foi fixada em formalina tamponada neutra 10% (potencial de Hidrogênio - pH 7) de 24 a 48 horas e processada em parafina para análise histológica. Esse tecido esplênico serviu de controle – porção superior controle (PSc) para o polo inferior do baço no exame microscópico.

5.5 Pós-operatório

Após os procedimentos cirúrgicos, ainda anestesiados, os animais foram identificados com marca na orelha e devolvidos à sua gaiola de origem. Receberam paracetamol (Tylenol[®], Janssen-Cilag - São Paulo, Brasil) na dose de 200 mg/Kg, via oral, dissolvido na água do bebedouro (72 horas), dieta livre e água à vontade. Foi anotada a evolução dos animais em todo o período do pós-operatório.

5.6 Oxigenoterapia hiperbárica

A oxigenoterapia hiperbárica foi realizada somente nos animais do grupo B, conforme protocolo⁷⁸: os animais no interior da câmara hiperbárica (FIG. 2) foram submetidos à compressão gradual até 2,5 atmosferas, pelo período de 15 minutos, sendo mantidos nessa pressão por 90 minutos, seguido de decompressão gradual da câmara por 15 minutos. Esse procedimento foi realizado duas vezes por dia durante três dias e uma vez por dia durante sete dias.



FIGURA 2 - Câmara hiperbárica (CHV- Vitória Montadora e distribuidora Ltda- Vitória-ES) com formato cilindro capsular construída com aço carbono.

1- Entrada e saída da câmara; 2- Válvula para escape do oxigênio; 3- Termômetro; 4- Manômetro; 5- Tubo para entrada de oxigênio no interior da câmara; 6- Visor para observação dos animais no interior da câmara; 7- Tampa oclusora da câmara. A Câmara tem 27 cm de largura, 51cm de comprimento e 1,5cm de espessura.

5.7 Eutanásia dos animais e extirpação do tecido esplênico remanescente

No 15^o e 45^o dias pós-operatório, os ratos do grupo A e do grupo B foram pesados (balança eletrônica Filizola[®] modelo MF-6 - sensibilidade de 1 g) e

anestesiados com tiopental sódico (Thiopentax[®], Cristália - São Paulo, Brasil) intraperitonealmente (50 mg/Kg). Em seguida, procedeu-se à eutanásia mediante sobredose de tiopental sódico e cloreto de potássio 10% (Farmace - Ceará, Brasil) intracardíaco (300 mg/Kg). Os animais foram submetidos à laparotomia por meio de incisão em “U” invertido na parede abdominal. Na exploração da cavidade, verificou-se o aspecto das vísceras abdominais, presença ou não de aderências e o aspecto do polo inferior do baço. Esse tecido remanescente esplênico foi extirpado para exame.

5.8 Medida e pesagem do polo inferior do baço

Antes da sua retirada, o polo inferior foi medido (comprimento, largura, espessura), na sua parte central, com um paquímetro de plástico (FIG. 3), do mesmo modo que se fez durante a ESTPI. A seguir, o polo inferior de cada animal foi extirpado e pesado em uma balança Adventurer OHAUS[®] modelo AR 3130 com precisão de 0,001 g. Esses dados (medida e peso do polo inferior) foram anotados nas fichas dos respectivos animais.

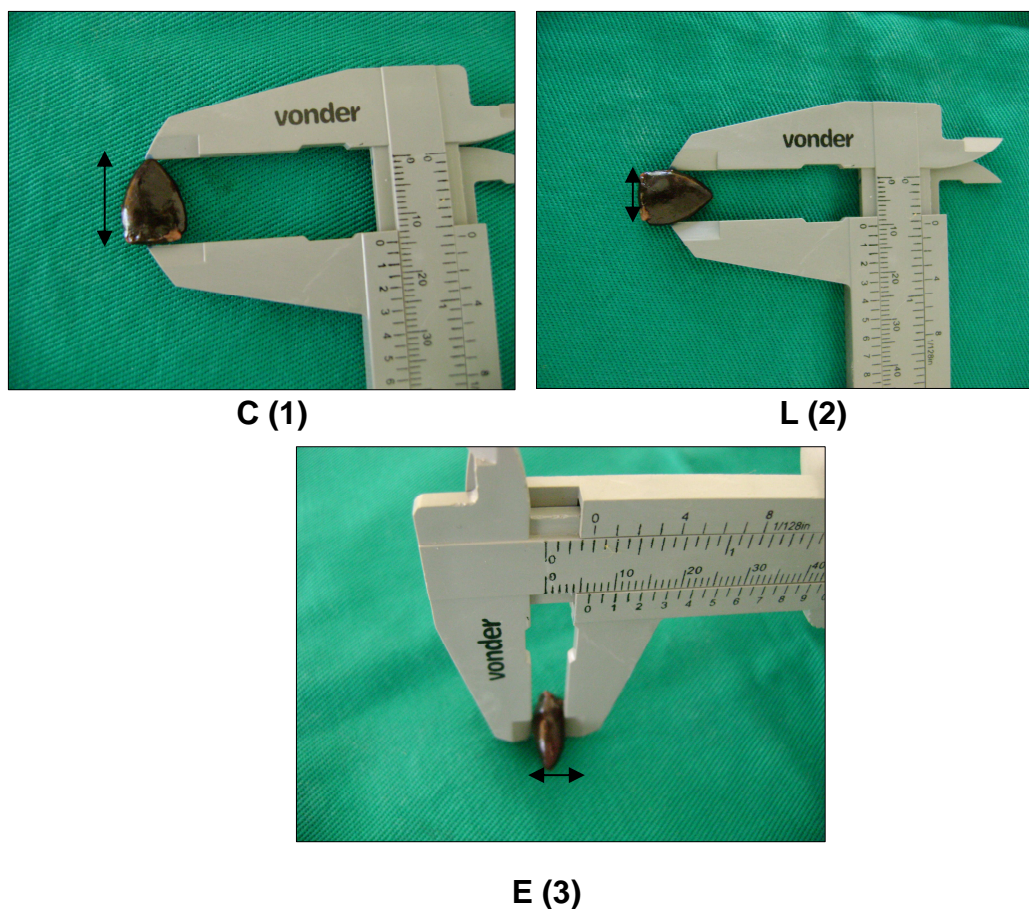


FIGURA 3 - Locais das medidas do comprimento - C (1), largura - L (2) e espessura - E (3) do polo inferior do baço de ratos, com o auxílio de um paquímetro de plástico na época da eutanásia.

Observação: as medidas do polo inferior foram feitas antes da sua retirada do animal, conforme descrito no texto.

5.9 Exame macroscópico

O polo inferior do baço de cada animal foi analisado macroscopicamente quanto à cor, consistência e presença ou não de necrose. A seguir, foi fotografado e fixado em solução de formalina tamponada neutra 10% (pH 7) de 24 a 48 horas e processado em parafina para análise morfológica.

5.10 Exame microscópico

Os fragmentos da porção superior (terço superior e médio) e do polo inferior do baço foram processados em blocos de parafina cortados com 3 μm de espessura e corados com hematoxilina-eosina. A microscopia foi realizada por dois patologistas em microscopia binocular, que desconheciam o subgrupo a que pertencia o animal.

Foram analisadas 10 lâminas do subgrupo A15, 10 do subgrupo A45, 10 do subgrupo B15, 10 do subgrupo B45 e 10 lâminas com tecido da porção superior do baço, por meio de escolha aleatória (controle). Em cada lâmina os patologistas examinaram 10 campos aleatórios (aumento de 100X) e pesquisaram os seguintes parâmetros: folículos linfáticos (centros germinativos), quantidade de linfócitos, quantidade de sinusoides, proliferação celular e número de vasos.

5.11 Variáveis estudadas e testes estatísticos

- Peso dos ratos, peso, comprimento, largura e espessura do polo inferior do baço foram avaliados por meio da estatística descritiva para cálculo da média aritmética e desvio-padrão;
- comparação do peso dos animais do pré-operatório com o do pós-operatório (10^o, 15^o e 45^o dia) nos grupos A e B foi feita utilizando-se o teste “t” de Student para amostras relacionadas. Esse teste foi também utilizado para comparar o comprimento, a largura e a espessura do polo inferior dos animais dos grupos tratados e não-tratados com oxigênio hiperbárico, do início para o final do experimento;
- comparação entre o peso do polo inferior dos animais tratados com os não tratados foi feita utilizando-se o teste “t” de Student para amostras independentes;
- comparação da frequência de viabilidade do polo inferior entre os animais tratados com os animais não tratados foi realizada pelo teste exato de Fisher.

Todos os testes foram bicaudais e os valores de “ p ” foram considerados significantes quando iguais ou inferiores a 5%.

6 RESULTADOS

6.1 Exame da cavidade abdominal

As vísceras abdominais não apresentaram alterações em relação à primeira cirurgia (transoperatório). Foram constatadas apenas aderências do polo inferior do baço às estruturas vizinhas (estômago, omento maior), em todos os animais tratados ou não com oxigênio hiperbárico.

6.2 Sobrevida dos animais no pós-operatório

Não houve óbito em ambos os grupos. No entanto, um dos animais do subgrupo B15 foi excluído do trabalho por apresentar sinais de desidratação (pelos eriçados, adinamia e frequência respiratória alta) na terceira sessão de oxigenoterapia hiperbárica. Alguns animais tratados com oxigênio hiperbárico apresentaram cromodaciorreia, que é indicadora de estresse.

6.3 Peso dos animais

Verificou-se aumento de peso nos subgrupos A15 ($p < 0,0001$), A45 ($p < 0,0001$), B15 ($p < 0,0001$) e B45 ($p < 0,0001$), do início para o final do experimento. Os animais do grupo A ganharam peso do 1º ao 10º dia de experimento ($p < 0,0001$).

No grupo tratado com oxigênio hiperbárico, os animais do subgrupo B15 e do subgrupo B45 perderam peso do 1º ao 10º dia de pós-operatório ($p < 0,01$) (TAB. 1). Posteriormente ganharam peso ($p < 0,0001$).

TABELA 1

Peso (g) dos ratos dos grupos tratados e não tratados com oxigênio hiperbárico, no pré-operatório, no 10º dia e no pós-operatório, submetidos à esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior (ESTPI)

Grupo	Subgrupo	Pré-operatório		p	Pós-operatório		p ₁	p ₂
		MA	DP		MA	DP		
A	A15	302,80 ±	319,90 ±	< 0,0001	339,40 ±	< 0,0001	< 0,0001	
		8,54	9,80		8,26			
	A45	294,40 ±	314,30 ±	< 0,0001	382,50 ±	< 0,0001	< 0,0001	
		4,52	6,05		18,43			
B	B15	293,33 ±	288,22 ±	< 0,01	309,44 ±	< 0,0001	< 0,0001	
		11,73	9,99		14,96			
	B45	286,00 ±	281,10 ±	< 0,01	412,10 ±	< 0,0001	< 0,0001	
		8,76	10,50		27,40			

A- grupo de animais submetidos à ESTPI, não tratados com oxigênio hiperbárico. A15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15º dia. A45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45º dia.

B- grupo de animais submetidos à ESTPI, tratados com oxigênio hiperbárico. B15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15º dia. B45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45º dia.

MA- Média aritmética; **DP**- Desvio-padrão.

Teste t para amostras relacionadas. $p \leq 0,05$ significativa; **p**- comparação entre o peso dos animais do mesmo subgrupo, entre o pré-operatório e o 10º dia do experimento; **p₁** - comparação entre o peso dos animais do mesmo subgrupo, entre o pré-operatório e o pós-operatório do experimento; **p₂** - comparação entre o peso dos animais do mesmo subgrupo, entre o 10º dia e o pós-operatório do experimento.

6.4 Peso do polo inferior remanescente

Nos animais do grupo A, encontrou-se menos peso médio do polo inferior no final do experimento no subgrupo A15 do que no subgrupo A45 ($p < 0,01$). Nos animais do grupo B, verificou-se menos peso médio do polo inferior no 15º dia de pós-operatório, na comparação com o peso médio do polo inferior no 45º dia de pós-operatório ($p > 0,05$). Não houve diferença nos pesos do polo inferior entre os subgrupos A15 e B15 no final do experimento, o que também ocorreu entre os subgrupos A45 e B45 (TAB. 2).

TABELA 2

Peso final do polo inferior do baço em ratos tratados e não tratados com oxigênio hiperbárico no pós-operatório mediato (15^o dia) e no pós-operatório tardio (45^o dia), submetidos à esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior (ESTPI)

Grupo	Subgrupo	Peso final		p_1	p_2
		MA	DP		
A	A15	170,00 ± 101,90		<0,01	>0,05
	A45	303,10 ± 68,81			
B	B15	162,55 ± 68,70		>0,05	>0,05
	B45	219,80 ± 117,11			

A- grupo de animais submetidos à ESTPI, não tratados com oxigênio hiperbárico. A15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15^o dia. A45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45^o dia. **B**- grupo de animais submetidos à ESTPI, tratados com oxigênio hiperbárico. B15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15^o dia. B45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45^o dia.

MA- Média aritmética; **DP**- Desvio-padrão. Teste t para amostras independentes. $p \leq 0,05$ significativa. p_1 - comparação entre os subgrupos Ant15 e Ant45 e comparação entre os subgrupos B15 e B45, no final do experimento. p_2 - comparação entre os subgrupos A15 e B15 e comparação entre os subgrupos A45 e B45, no final do experimento.

6.5 Medida do polo inferior remanescente

Nos animais do subgrupo A15, o polo inferior do baço diminuiu em comprimento, largura e espessura do início para o final do experimento ($p > 0,05$). No subgrupo B15, o polo inferior do baço não sofreu alterações significantes no comprimento e largura, embora tenha ocorrido aumento da espessura, mas também sem significância do início para o final do experimento.

Nos ratos do subgrupo A45 não houve alteração significativa da largura e espessura do polo inferior do baço do início para o final do experimento. Porém, registrou-se significativo aumento do comprimento desse remanescente ($p < 0,01$). Nos ratos do subgrupo B45, verificou-se aumento do comprimento, da largura e da espessura do polo inferior do início para o final do experimento, mas somente a espessura do polo inferior apresentou crescimento significativo ($p < 0,05$) (TAB. 3, 4 e 5).

TABELA 3

Comprimento do polo inferior do baço em ratos tratados e não tratados com oxigênio hiperbárico no pré e pós-operatório mediato (15º dia) e no pré e pós-operatório tardio (45º dia) submetidos à esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior (ESTPI)

Grupos	Subgrupos	Comprimento inicial		Comprimento final		p
		MA	DP	MA	DP	
A	A15	9,90 ± 2,07		8,60 ± 1,50		> 0,05
	A45	10,10 ± 1,28		11,70 ± 1,70		< 0,01
B	B15	8,44 ± 1,57		8,22 ± 1,78		> 0,05
	B45	8,90 ± 1,66		10,35 ± 2,22		> 0,05

A- grupo de animais submetidos à ESTPI, não tratados com oxigênio hiperbárico. A15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15º dia. A45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45º dia. **B-** grupo de animais submetidos à ESTPI, tratados com oxigênio hiperbárico. B15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15º dia. B45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45º dia. **MA-** Média aritmética; **DP-** Desvio-padrão. Teste t para amostras relacionadas.

p ≤ 0,05 significante; **p** - comparação entre o comprimento do polo inferior dos animais do mesmo subgrupo, entre o início e o final do experimento.

TABELA 4

Largura do polo inferior do baço em ratos tratados ou não com oxigênio hiperbárico no pré e pós-operatório mediato (15º dia) e no pré e pós-operatório tardio (45º dia) submetidos à esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior (ESTPI)

Grupos	Subgrupos	Largura inicial		Largura final		p
		MA	DP	MA	DP	
A	A15	8,50 ± 1,17		7,50 ± 1,95		> 0,05
	A45	8,50 ± 0,52		9,30 ± 1,05		> 0,05
B	B15	7,66 ± 0,66		7,50 ± 1,93		> 0,05
	B45	7,90 ± 0,99		9,05 ± 1,69		> 0,05

A- grupo de animais submetidos à ESTPI, não tratados com oxigênio hiperbárico. A15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15º dia. A45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45º dia. **B-** grupo de animais submetidos à ESTPI, tratados com oxigênio hiperbárico. B15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15º dia. B45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45º dia.

MA- Média aritmética; **DP-** Desvio-padrão.

Teste t para amostras relacionadas. p ≤ 0,05 significante; **p** - comparação entre a largura do polo inferior dos animais do mesmo subgrupo, entre o início e o final do experimento.

TABELA 5

Espessura do polo inferior do baço em ratos tratados e não tratados com oxigênio hiperbárico no pré e pós-operatório mediato (15º dia) e no pré e pós-operatório tardio (45º dia) submetidos à esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior (ESTPI)

Grupos	Subgrupos	Espessura inicial		Espessura final		p
		MA	DP	MA	DP	
A	A15	4,20 ± 0,91		3,35 ± 1,05		> 0,05
	A45	4,00 ± 0,81		4,45 ± 0,89		> 0,05
B	B15	3,44 ± 0,46		3,61 ± 0,74		> 0,05
	B45	3,15 ± 0,57		4,35 ± 1,13		< 0,05

A- grupo de animais submetidos à ESTPI, não tratados com oxigênio hiperbárico. A15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15º dia. A45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45º dia. **B-** grupo de animais submetidos à ESTPI, tratados com oxigênio hiperbárico. B15 - subgrupo de animais eutanasiados no 15º dia. B45 - subgrupo de animais eutanasiados no 45º dia.

MA- Média aritmética. **DP-** Desvio-padrão.

Teste t para amostras relacionadas; $p \leq 0,05$ significante; **p** - comparação entre a espessura do polo inferior dos animais do mesmo subgrupo, entre o início e o final do experimento.

6.6 Avaliação macroscópica do polo inferior

Em oito casos do subgrupo A15 o aspecto macroscópico do polo inferior encontrava-se normal. As aderências do polo inferior ao omento, lobo hepático e alças intestinais estiveram presentes em 60% dos casos. Foram observados vasos na periferia do polo inferior do baço aderidos ao omento. Em dois animais desse subgrupo (20%) detectou-se necrose na extremidade e na porção central do polo inferior. O aspecto macroscópico do polo inferior no subgrupo B15 foi viável em todos os casos, com aderências vascularizadas pelo omento maior, alças intestinais e fígado.

Nos ratos do subgrupo A45, o aspecto macroscópico do polo inferior encontrava-se normal em todos os casos, com aderências vascularizadas pelo omento maior, alças intestinais e fígado. Somente em um caso foram descritas poucas aderências. Nos animais do subgrupo B45, o aspecto macroscópico do polo inferior encontrava-se viável em todos os casos, com aderências

vascularizadas pelo omento maior, alças intestinais e fígado. Não houve diferença macroscópica entre os subgrupos A45 e B45 (FIG. 4).

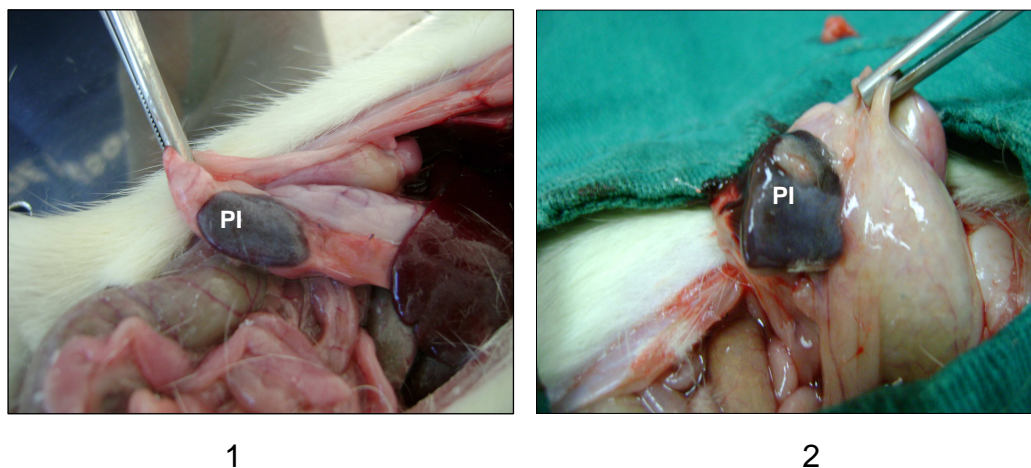


FIGURA 4 - Aspecto macroscópico do polo inferior em um animal não tratado com oxigênio hiperbárico.

Subgrupo Ant45 (1) e em um animal tratado com OHB - subgrupo Bt45 (2). Aspecto macroscópico do polo inferior (PI) é semelhante.

6.7 Avaliação microscópica do polo inferior

Os folículos linfáticos encontravam-se maiores e mais frequentes no polo inferior dos animais do subgrupo A15 do que na porção superior controle (PSc) (FIG. 5 e 6). Esses folículos estavam maiores no polo inferior dos animais dos subgrupos A45, B15, B45 do que no dos animais do subgrupo A15 e na PSc (FIG. 5, 6, 7, 8 e 9). A presença de linfócitos foi mais frequente no polo inferior do baço dos animais do subgrupo A15 do que na PSc (FIG. 5 e 6).

Inferiu-se mais quantidade de linfócitos nos subgrupos A45, B15 e B45 do que na PSc. Não houve diferença marcante na quantidade de sinusoides entre a PSc e o polo inferior dos quatro subgrupos em estudo morfológico convencional. Porém, chama a atenção o aumento celular e vascular nos subgrupos B15 e B45 quando comparado ao polo inferior dos subgrupos A15 e A45 (FIG. 6, 7, 8 e 9). A proliferação celular foi mais acentuada no polo inferior do subgrupo A15 do que na PSc e foi menos intensa na PSc do que nos demais subgrupos.

Verificou-se aumento da proliferação celular linfocítica no subgrupo A45, B15 e B45 (FIG. 7, 8 e 9). A existência de células na parede e no interior dos vasos foi intensa no polo inferior dos subgrupos B15 e B45, o que ocorreu com menos intensidade na PSc (FIG. 5, 8 e 9).

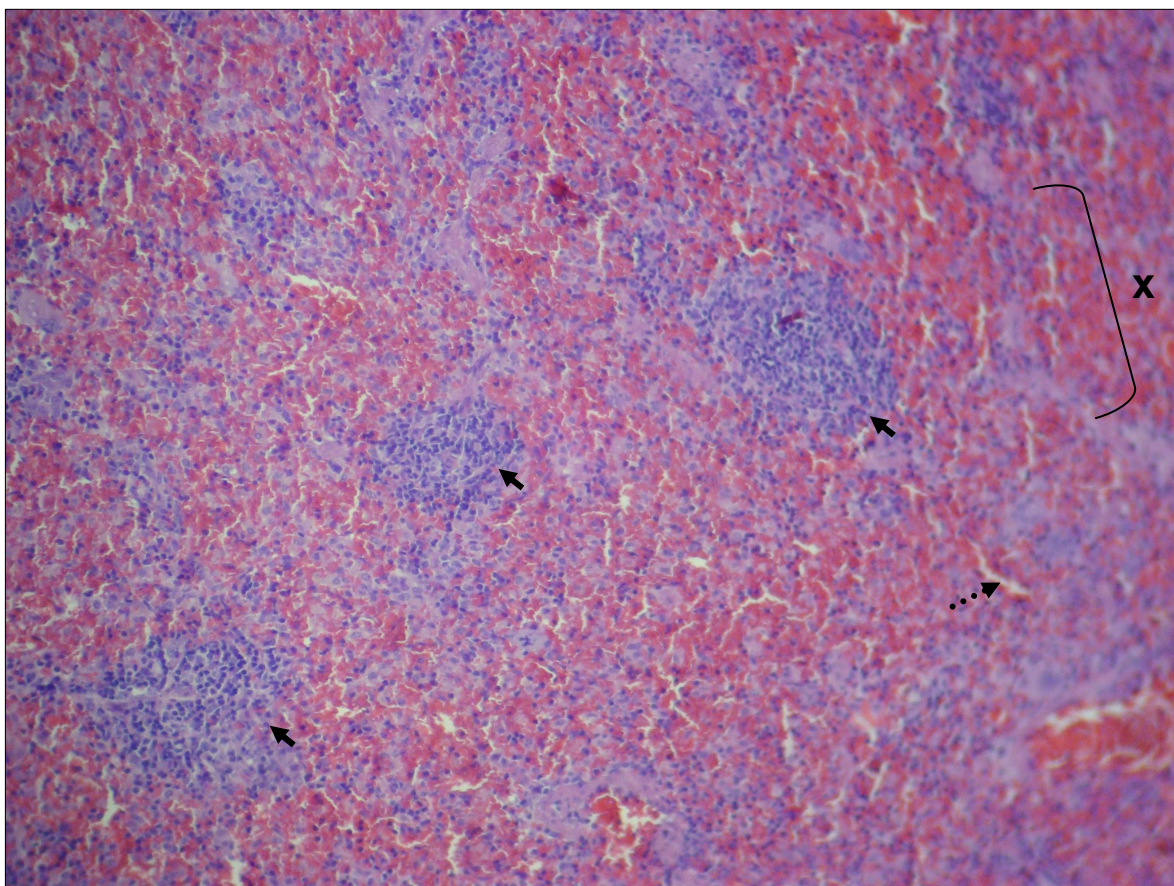


FIGURA 5 - Fotomicrografia da porção superior do baço (PSc).

Observar a quantidade de folículos linfáticos (setas), presença de sinusoides (seta pontilhada) e proliferação celular em cordões esplênicos, dentro e fora dos vasos (sinusoides) (x).

Corado por hematoxilina-eosina e com aumento de 100X.

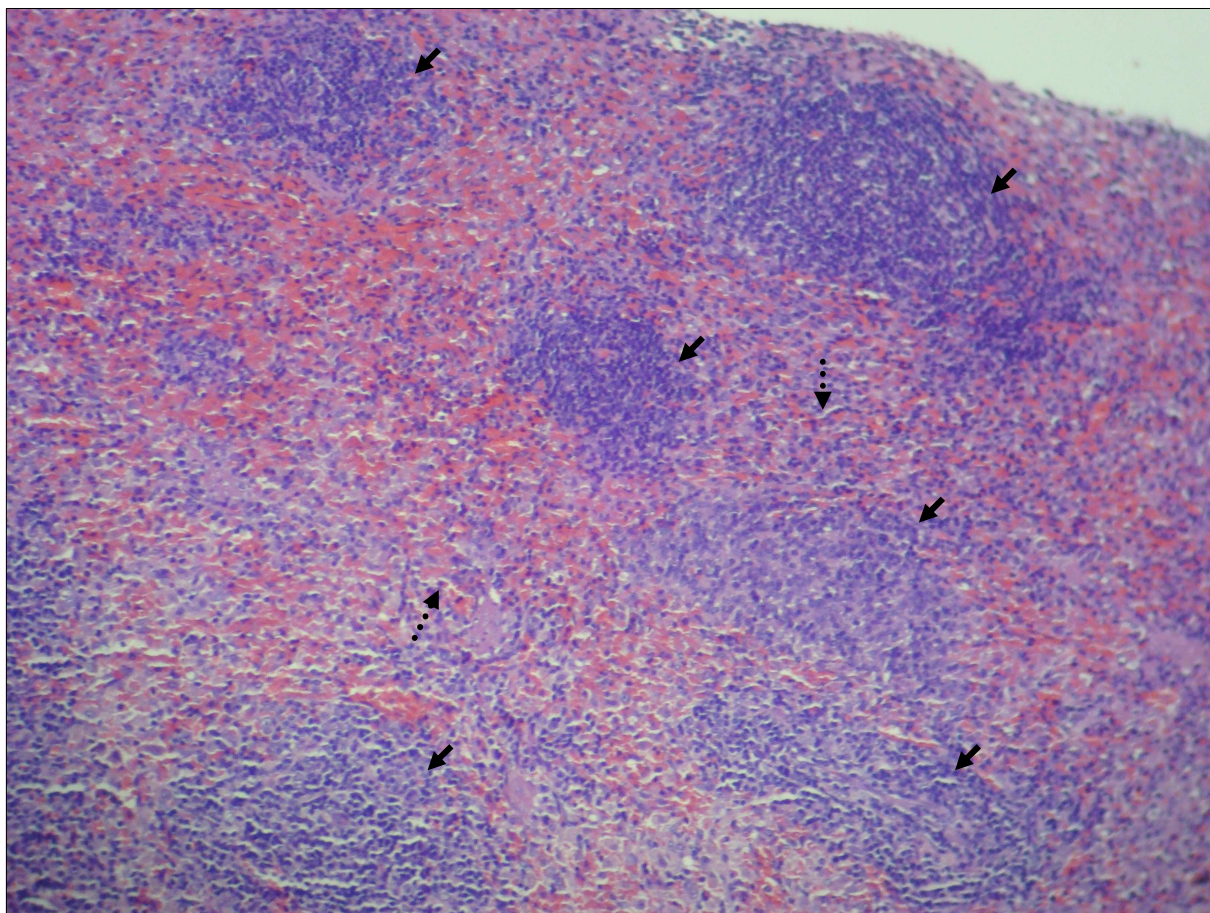


FIGURA 6 - Fotomicrografia do polo inferior do baço - Subgrupo Ant15.

Observar a quantidade de folículos linfáticos (setas) e presença de sinusoides (setas pontilhadas). Os folículos linfáticos foram mais frequentes e maiores nesse grupo que na PSc. Os linfócitos foram também mais frequentes que na PSc. Corado por hematoxilina-eosina e com aumento de 100X.

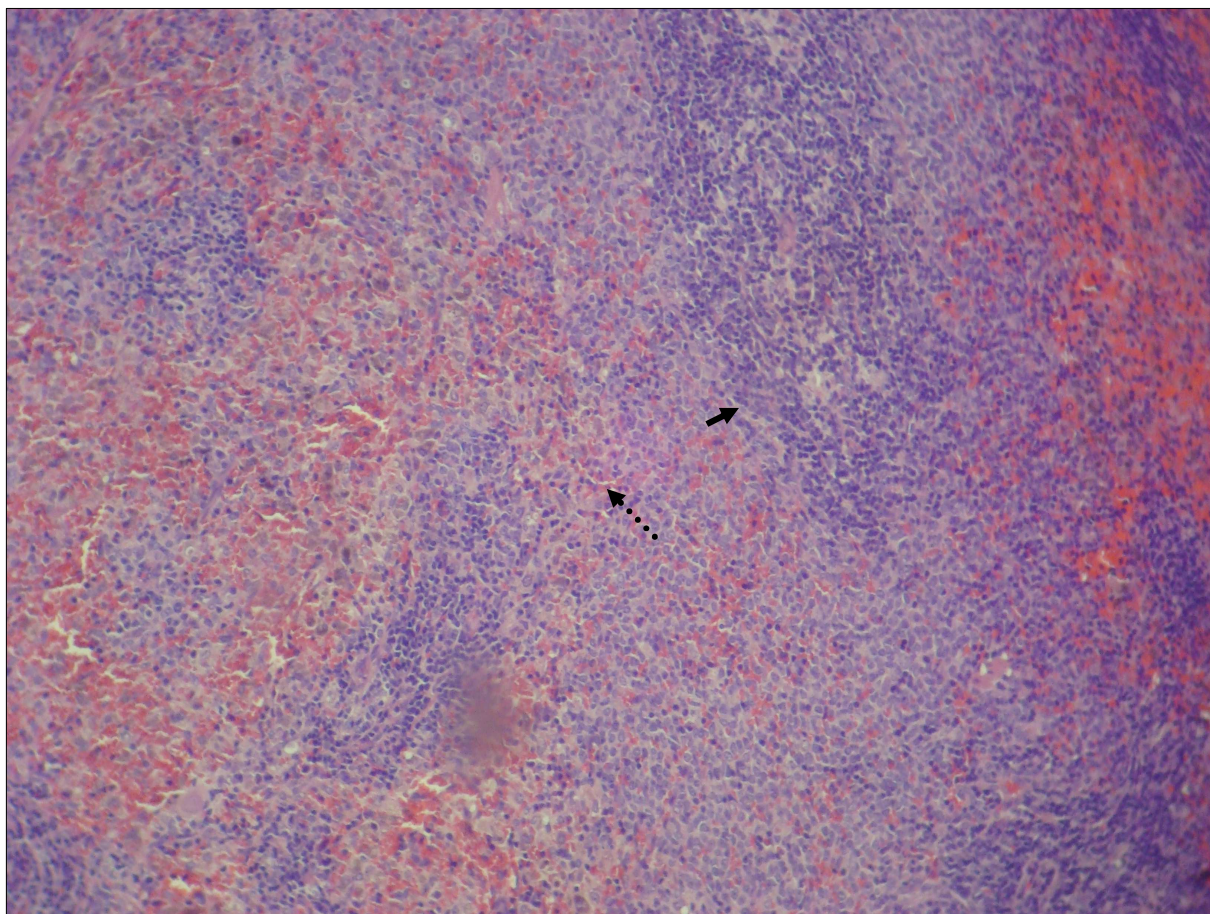


FIGURA 7 - Fotomicrografia do polo inferior do baço - Subgrupo Ant45.

Observar folículos linfáticos grandes (seta) e a presença de sinusoides (seta pontilhada).
Notar mais quantidade de linfócitos nesse grupo que na PSc.
Corado por hematoxilina-eosina e com aumento de 100X.

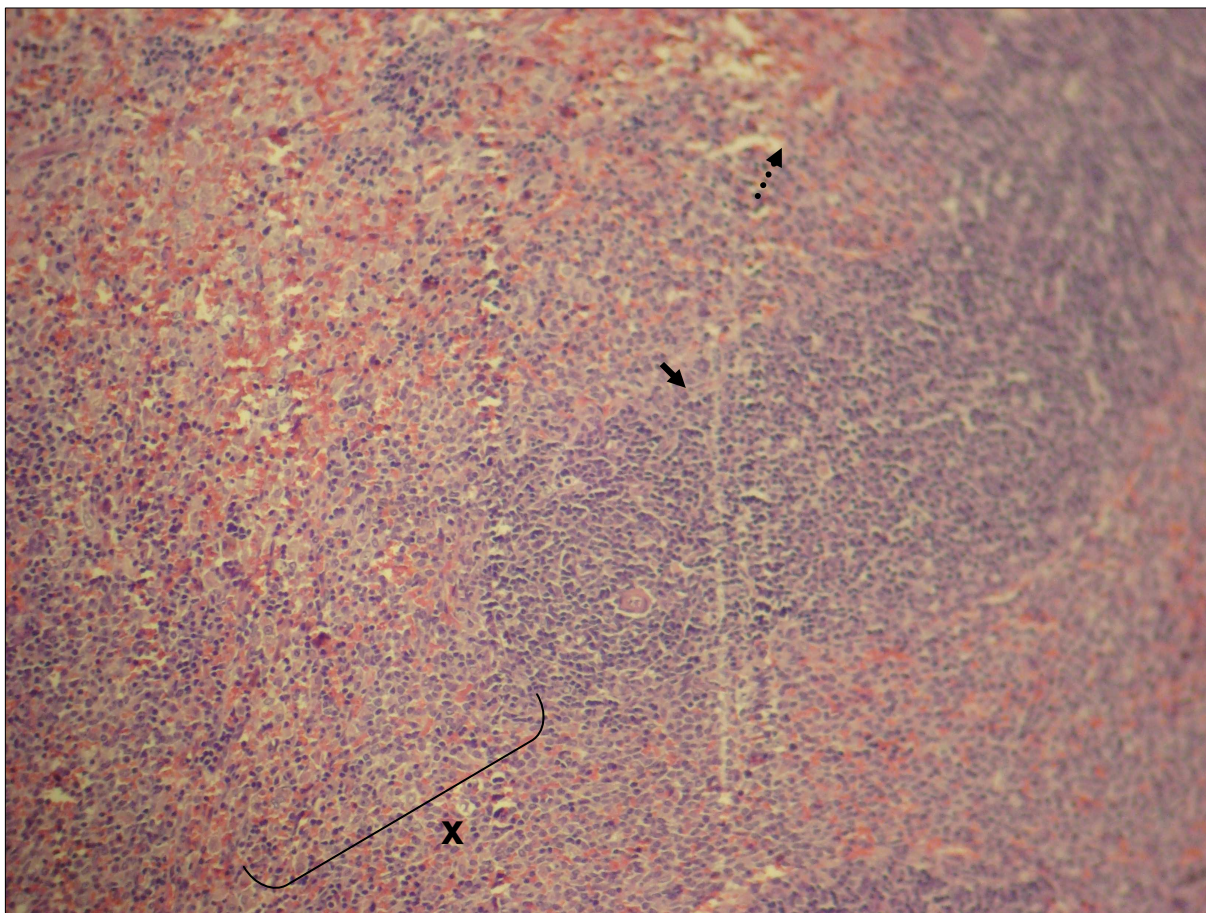


FIGURA 8 - Fotomicrografia do polo inferior do baço - Subgrupo Bt15.

Observar folículos linfáticos aumentados (seta), presença de sinusoides (seta pontilhada) e proliferação celular em cordões esplênicos, dentro e fora dos vasos (sinuspides) (x). Mais quantidade de linfócitos nesse grupo do que na PSc. Notar mais quantidade de células e vasos nesse subgrupo do que nos subgrupos Ant15 e Ant45. Corado por hematoxilina-eosina e com aumento de 100X.

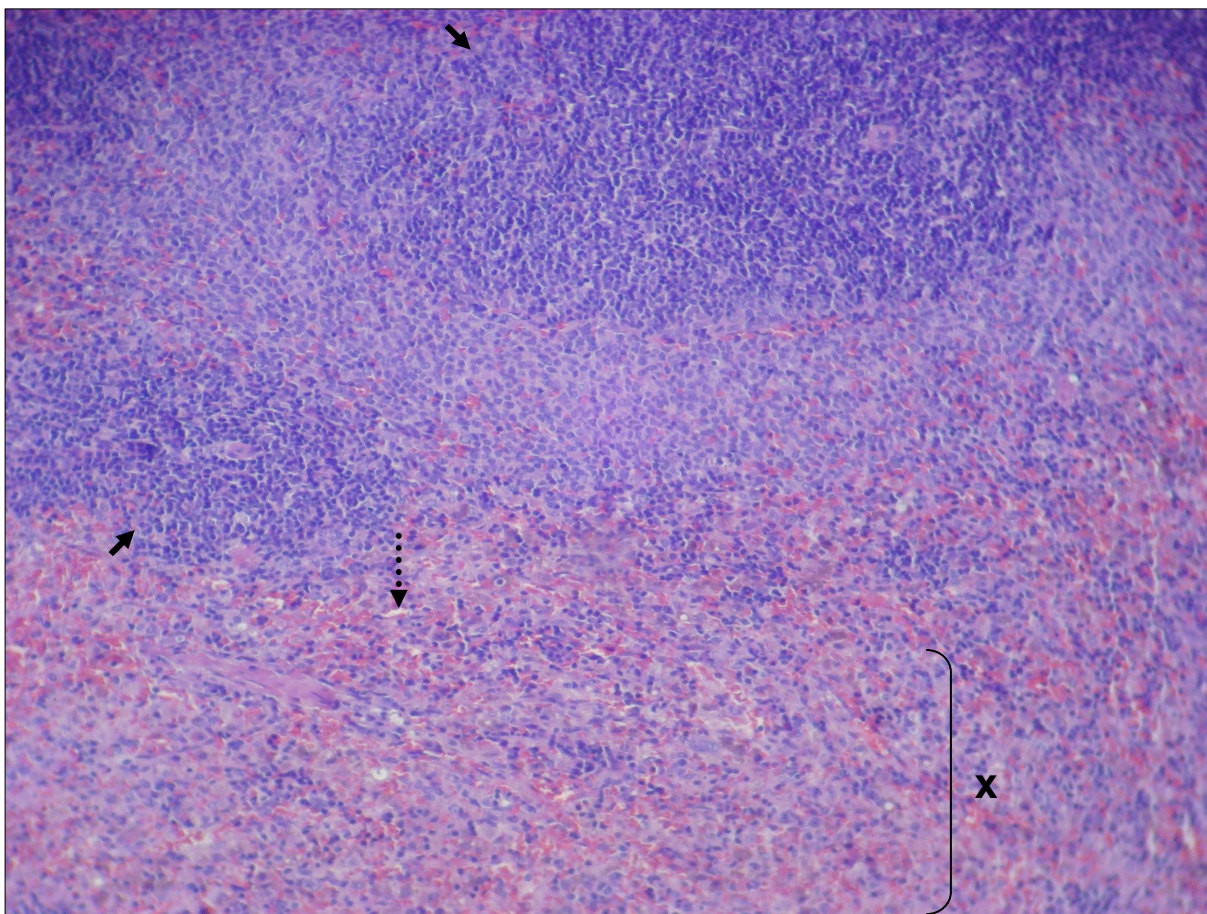


FIGURA 9 - Fotomicrografia do polo inferior do baço - Subgrupo Bt45.

Observar folículos linfáticos aumentados (setas), presença de sinusoides (seta pontilhada) e proliferação celular em cordões esplênicos, dentro e fora dos vasos (sinusoides) (x). Observar mais quantidade de vasos neste subgrupo do que nos subgrupos Ant15 e Ant 45.

Corado por hematoxilina-eosina e com aumento de 100X.

7 DISCUSSÃO

O aumento da susceptibilidade à infecção, que pode ocorrer em pacientes esplenectomizados, tem induzido a realização de operações conservadoras no baço. A preservação do tecido esplênico é importante para evitar a imunodeficiência causada pela esplenectomia, principalmente em crianças^{2,80,81}. Bradshaw e Thomas (1982) relataram que quanto maior o remanescente esplênico, mais expressiva a proteção contra a sepse. E calcularam em 25% a massa crítica de tecido esplênico residual para se ter função fagocitária normal⁸². Essa sugestão é aceita pela maioria dos autores. Van Wick *et al.*, em trabalho experimental em ratos, consideraram necessária a manutenção de 1/3 do tecido esplênico total para restaurar a função esplênica⁸³. Nesse trabalho, em que se fez a ESTPI, foi mantido cerca de 1/3 do tecido esplênico.

Na realização da ESTPI, é importante observar os cuidados técnicos descritos por Paulo *et al.*, em 2006³⁴. No presente estudo foram seguidas duas outras recomendações feitas pelo autor da técnica da ESTPI³⁰. A primeira foi preservar a fina e transparente prega peritoneal que vai da face anterior da curvatura maior do antro à superfície anterior do polo inferior do baço. Essa conduta foi adotada para manter esse remanescente fixo, ou seja, com a sua superfície de corte voltada cranialmente, que coberta naturalmente pelo omento maior. A segunda foi não fixar o polo inferior à curvatura maior do estômago com a intenção de evitar a torção desse remanescente. Em experiências anteriores em que se realizou a fixação do polo inferior do baço o percentual de necrose foi elevado, provavelmente devido ao comprometimento de pequenos vasos, por tração ou torção.

A OHB foi realizada de acordo com o protocolo recomendado por Paulo *et al.*, em 2005⁷⁸. Esses autores sugeriram duas sessões de OHB nos três primeiros dias e uma sessão diária nos sete dias após a ESTPI para melhorar a viabilidade do polo inferior ou mesmo acelerar seu crescimento, visto que esse tratamento possui efeito angiogênico. Paulo *et al.*, em 1999, referiram em cães, no pós-operatório precoce, indícios de comprometimento da viabilidade e da função do

polo inferior³⁰. Daí, a utilização de OHB em ratos submetidos à ESTPI poderia melhorar a viabilidade desse remanescente.

Neste estudo não houve complicações cirúrgicas. Todos os animais submetidos à ESTPI evoluíram satisfatoriamente. Apenas um animal do subgrupo B15 foi excluído do tratamento com oxigênio hiperbárico porque manifestou, no terceiro dia de pós-operatório, após a sessão de OHB, indícios de desidratação: pelos eriçados, adinamia e frequência respiratória alta. Apesar disso, todos os animais sobreviveram.

A OHB, no entanto, pode contribuir para que o animal perca peso, conforme foi demonstrado em estudo anterior⁴⁴. Nesta pesquisa esse fato ocorreu nos animais do grupo B durante os 10 primeiros dias de tratamento com oxigênio hiperbárico. Contudo, os não tratados com oxigênio hiperbárico tiveram ganho de peso durante esse período. Paulo *et al.*, em 2008, reportaram diminuição de peso em todos os animais tratados com OHB e eutanasiados no 11º dia pós-operatório³⁸. As possíveis causas de emagrecimento foram a manipulação diária dos ratos, sua permanência dentro da câmara hiperbárica no período previsto pelo protocolo e o estresse resultante do procedimento. Neste estudo, alguns animais submetidos à OHB apresentaram cromodacriorreia (lágrima vermelha), que é indicadora de estresse ou sofrimento em ratos⁷⁹. Desta forma, torna-se interessante promover uma avaliação dosando hormônios (catecolaminas, cortisol) para comparar o nível de estresse dos animais submetidos ao tratamento com OHB com os não submetidos a esse tratamento. Cumpre lembrar que do 10º para o 15º dia de pós-operatório os animais do subgrupo B15 ganharam peso de forma significativa.

A viabilidade do polo inferior foi vista macroscopicamente em 80% dos animais não tratados (subgrupo A15) e em 100% dos animais tratados com oxigênio hiperbárico (subgrupo B15). Essa diferença, no entanto, não foi significativa. A análise microscópica revelou que os animais do subgrupo B15 em relação aos do subgrupo A15 exibiram folículos linfáticos maiores, mais quantidade de células e de vasos e mais proliferação celular linfocítica. Esses dados sugerem melhor viabilidade nos animais tratados com oxigênio hiperbárico que nos não tratados nos subgrupos de 15 dias.

Sabe-se que a OHB possui efeito angiogênico, o que pode ter contribuído para os resultados deste trabalho. O efeito protetor da OHB sobre o polo inferior

já foi relatado³⁸. No 45º dia não houve diferença na viabilidade desse polo entre os subgrupos tratados e não tratados com oxigênio hiperbárico sob o ponto de vista macroscópico. Porém, houve mais quantidade de vasos e de células no subgrupo B45 em relação ao A45 na avaliação microscópica, o que ocorreu em relação aos folículos linfáticos, linfócitos e proliferação celular linfocítica. Isso parece indicar que a OHB no subgrupo de 45 dias teve efeito tão marcante quanto no subgrupo de 15 dias. É importante lembrar que a OHB foi administrada durante os 10 primeiros dias de pós-operatório e que o subgrupo B45 ficou sem o referido tratamento por 35 dias. Assim, durante esse período de não-tratamento, os fenômenos ocorridos no subgrupo A45 poderiam ter contribuído para evitar as diferenças macro e microscópicas entre os polos inferiores dos grupos tratados e não tratados com oxigênio hiperbárico. Cumpre lembrar que o aspecto morfológico não tem necessariamente correspondência funcional. Portanto, o tecido pode ser viável e aparentar normalidade mesmo sem funcionar adequadamente⁸⁴.

O crescimento do polo inferior do baço já havia sido mencionado. Torres *et al.*, em modelo de esplenectomia subtotal diferente da ESTPI, descreveram a regeneração desse remanescente em ratos no 45º dia³⁶. Não se sabia, no entanto, se a OHB poderia interferir no crescimento desse polo. Daí foi realizada a presente pesquisa, para dirimir essa dúvida. Neste trabalho, no 15º dia, não se verificou crescimento do polo inferior nos animais tratados ou não com oxigênio hiperbárico quando foram medidos o comprimento, a largura e a espessura do polo do início para o final do experimento. Porém, nos subgrupos de 45 dias esse remanescente cresceu. Obteve-se crescimento significativo do comprimento do polo inferior do baço no subgrupo A45 e da espessura deste polo no subgrupo B45. Cumpre ressaltar que o crescimento desse remanescente é sugerido pelo fato de que seu peso médio nos animais de 45 dias foi acentuadamente mais alto do que o dos animais de 15 dias não tratados com oxigênio hiperbárico. Nos animais tratados, o referido polo foi mais pesado no grupo de 45 dias, porém de forma não significativa. Na análise microscópica, os subgrupos A45, B15 e B45, quando comparados ao subgrupo A15, mostraram folículos linfáticos aumentados, mais quantidade de linfócitos, mais proliferação celular e mais números de vasos. Isso sugere mais crescimento do polo inferior desses subgrupos. Embora esse

crescimento não tenha ocorrido macroscopicamente no subgrupo B15, a microscopia mostra indícios de crescimento.

Esses resultados permitem considerar que as alterações morfológicas do polo inferior do baço ocorrem ao longo do tempo. Paulo *et al.*, em 2008³⁷, fizeram essa mesma consideração, dando importância à melhora do metabolismo lipídico do baço. Em trabalho recente, mostrou-se que o polo inferior cresceu significativamente em comprimento, largura e espessura, do 1º dia ao 80º dia de pós-operatório, após a ESTPI. O sinal microscópico desse fenômeno foi a hiperplasia celular³⁷. O polo inferior do baço cresce por diferentes razões: crescimento do animal, processo inflamatório, fatores outros desconhecidos. Neste estudo, verificou-se aumento de peso dos animais entre o pré e o pós-operatório, nos grupos tratados ou não com oxigênio hiperbárico no 15º dia e 45º dia. É possível que no 45º dia de pós-operatório o processo inflamatório inicial tenha sido minimizado e, assim, não tenha contribuído para o crescimento do polo inferior.

Os estudos de imunistoquímica e genética molecular que estão sendo realizados na sequência deste trabalho poderão contribuir para esclarecer melhor essas questões.

8 CONCLUSÕES

Quanto ao estudo sobre os efeitos da oxigenoterapia hiperbárica em ratos submetidos à esplenectomia subtotal, pode-se concluir que:

- Causou diminuição do peso, mas não interferiu na sobrevivência dos animais
- Melhorou a viabilidade do polo inferior do baço, mas não interferiu no seu crescimento

REFERÊNCIAS

1. Babcock GF, Amoscato AA, Nishioda K. Effect of tuftsin on the migration, chemotaxis, and differentiation of macrophages and granulocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 1983; 419: 64-74.
2. Shandling B. Splenectomy for trauma: a second look. *Arch Surg.* 1976; 111(12): 1325-6.
3. Crosby WH. An historical sketch of splenic function and splenectomy. *Lymphology.* 1983; 16(2): 52-5.
4. Cooper MJ, & Williamson RC. Splenectomy: indications, hazards and alternatives. *Br J Surg.* 1984; 71(3): 173-80.
5. Feliciano DV, Bitondo CG, Mattox KL, Rumisek JD, Burch JM, Jordan GL Jr. A four-year experience with splenectomy versus splenorrhaphy. *Ann Surg.* 1985; 201(5): 568-75.
6. King H, & Shumacker Jr HB. Splenic studies. Susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. *Ann Surg.* 1952; 136(2): 239-42.
7. Morgenstern L, & Shapiro SJ. Techniques of splenic conservation. *Arch Surg.* 1979; 114(4): 449-54.
8. Resende V, & Petroianu A. Subtotal splenectomy for treatment of severe splenic injuries. *J trauma.* 1998; 44(5): 933-5.
9. Grosfeld JL, & Ranochak JE. Are hemisplenectomy and/or primary splenic repair feasible? *J Pediatr Surg.* 1976; 11(3): 419-24.
10. Goldthorn JF, Schwartz AD, Swift AJ, Winkelstein JA. Protective effect of residual splenic tissue after subtotal splenectomy. *J Pediatr Surg.* 1978; 13(6D): 587-90.
11. Andersson R, Alwmark, Bengmark S. Outcome of pneumococcal challenge in rats after splenic artery ligation or splenectomy. *Acta Chir Scand.* 1986; 152:15-7.
12. Morris DH, & Bullock FD. The importance of the spleen in resistance to infection. *Ann Surg.* 1919; 70(5): 513-21.
13. Robinette CD, & Fraumeni JF Jr. Splenectomy and subsequent mortality in veterans of the 1939-45 war. *Lancet.* 1977; 2(8029): 127-29.
14. Sugihara T, & Yawata Y. Observations on plasma and red cell lipids in hereditary spherocytosis. *Clin Chim Acta.* 1984; 137(2): 227-32.

15. Aviram M, Brook JG, Tatarsky J, Levy Y, Carte A. Increased low-density lipoprotein levels after splenectomy: a role for the spleen in cholesterol metabolism in myeloproliferative disorders. *Am J Med Sci.* 1986; 291(1): 25-8.
16. Asai K, Kuzuya M, Naito M, Funaki C, Kuzuya F. Effects of splenectomy on serum lipids and experimental atherosclerosis. *Angiology.* 1988; 39(6): 497-504.
17. Fatouros M, Bourantas K, Bairaktari E, Elisaf M, Tsolas O, Cassioumis D. Role of the spleen in lipid metabolism. *Br J Surg.* 1995; 82(12): 1675-7.
18. Paulo DNS, & Lázaro da Silva A. Lipídeos plasmáticos após esplenectomia total e parcial em cães. *Rev Col Bras Cir.* 2001; 28(3): 264-70.
19. Silva MM, Jamel N, Refinetti RA, Oliveira MAS, Padilha MS. Papel do baço no perfil lipídico - Estudo Experimental. *ABCD Arq Bras Cir Dig.* 2002; 15(2): 121-4.
20. Paulo ICAL, Paulo DNS, Lázaro da Silva A, Foletto RM, Colnago GL, Vargas PM. Níveis de lípidos plasmáticos em ratos submetidos à esplenectomia total, ligadura simultânea dos vasos esplênicos e a esplenectomia subtotal com preservação do pólo inferior. *Rev Col Bras Cir.* 2005; 32(5): 229-36.
21. Petroianu A, Veloso DFM, Costa GR, Alberti LR. Efeitos de operações sobre o baço no lipidograma de ratas. *Rev Assoc Med Bras.* 2006; 52(1): 56-9.
22. Warshaw AL. Conservation of the spleen with distal pancreatectomy. *Arch Surg.* 1988; 123(5): 550-3.
23. Zilberstein B, Sallet JA, Ramos A, Eshkenazy R. Video laparoscopy for the treatment of bleeding esophageal varices. *Surg Laparosc Endosc.* 1997; 7(3): 185-91.
24. Poulin EC, Mamazza J, Schlachta CM. Splenic artery embolization before laparoscopic splenectomy. An update. *Surg Endosc.* 1998; 12(6): 870-5.
25. Schertler T, Pfammatter T, Eid K, Wildermuth S. Embolization of the splenic artery after splenic gunshot wound. *Swiss Surg.* 2003; 9(2): 87-91.
26. Mignon F, Brouzes S, Breitel DL, Bastie JN, Poirier H, Legendre C, *et al.* Preoperative selective embolization allowing a partial splenectomy for splenic hamartoma. *Ann Chir.* 2003; 128(2): 112-6.
27. Campos-Christo M. Esplenectomias parciais regradas. *O Hospital.* 1959; 56(4): 93-8.
28. Toy FK, Reed WP, Taylor LS. Experimental splenic preservation employing microwave surgical techniques: a preliminary report. *Surgery.* 1984; 96(1): 117-21.

29. Petroianu A. Esplenectomia subtotal e anastomose esplenorrenal proximal para o tratamento da hipertensão portal. *Rev Bras Cir.* 1983; 73(3): 101-4.
30. Paulo DNS, Lázaro da Silva A, Cintra LC, Bof AM, Santiago DC, Ribeiro GB. Esplenectomia subtotal, em cães, com preservação do pólo inferior suprido por vasos do ligamento gastroesplênico. *Rev Col Bras Cir.* 1999; 26(3): 147-52.
31. Holdsworth RJ. Regeneration of the spleen and splenic autotransplantation. *Br J Surg.* 1991; 78(3): 270-8.
32. Marques RG. Autoimplante esplênico em ratos: regeneração morfológica e função fagocitária [tese-Doutorado]. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; 2001.
33. Resende V, Petroianu A, Junior WC. Autotransplantation for treatment of severe splenic lesions. *Emergency Radiology.* 2002; 9(4): 208-12.
34. Paulo DNS, Paulo ICAL, Kalil M, Vargas PM, Lázaro da Silva A, Baptista JFA, *et al.* Subtotal splenectomy preserving the lower pole in rats: technical, morphological and functional aspects. *Acta Cir Bras.* 2006; 21(5): 321-7.
35. Paulo ICAL, Paulo DNS, Cintra LC, Santos MCS, Rodrigues H, Ferrari TA, *et al.* Preservative spleen surgery and hiperbaric oxygen therapy. *Acta Cir Bras.* 2007; 22: 21-8.
36. Torres OJM, Macedo EL, Picciani ERG, Nunes PMS, Costa JVG, Carvalho AB, *et al.* Histological study of splenic regeneration in rats underwent to subtotal splenectomy. *Acta Cir Bras.* 2000; 15(2): 1-12.
37. Paulo DNS, Ramos BF, Zanetti FR, Marques T, Cintra LC, Paulo ICAL, *et al.* Growth of the lower spleen pole remaining after subtotal splenectomy in rats. *Acta Cir Bras.* 2008; 23(2): 125-9.
38. Paulo ICAL, Paulo DNS, Ferrari TA, Azeredo TCV de, Lázaro da Silva A. O pólo inferior do baço de ratos e a Oxigenoterapia hiperbárica. *Rev Assoc Med Bras.* 2008; 54(1): 77-81.
39. Muhonen A, Haaparanta M, Grönroos T, Bergman J, Knuuti J, Hinkka S, *et al.* Osteoblastic activity and RM neoangiogenesis in distracted bone of irradiated rabbit mandible with or without hyperbaric oxygen treatment. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 33(2): 173-8.
40. Cundall JD, Gardiner A, Chin K, Laden G, Grout P, Duthie GS. Hyperbaric oxygen in the treatment of fecal incontinence secondary to pudendal neuropathy. *Dis Colon Rectum.* 2003; 46(11): 1549-54.
41. Burt JT, Kapp JP, Smith RR. Hyperbaric oxygen and cerebral infarction in the gerbil. *Surg Neurol.* 1987; 28(4): 265-8.

42. Costa-Val R, Nunes TA, Oliveira e Silva RC, De Puy e Souza TK. Hyperbaric oxygen therapy in rats submitted to hepatic veins ligation: mortality valuation and histological study of liver and spleen. *Acta Cir Bras*. 2006; 21(1): 1-19.
43. Juang JH, Hsu BR, Kuo CH, Uengt SW. Beneficial effects of hyperbaric oxygen therapy on islet transplantation. *Cell Transplant*. 2002; 11(2): 95-101.
44. Paulo ICAL. Aspectos morfológicos e funcionais de auto-implantes esplênicos e do polo inferior do baço de ratos. Efeito da oxigenoterapia hiperbárica. [Tese-Doutorado]. Belo Horizonte(MG): Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.
45. Mayo WJ. Principles underlying surgery of the spleen. *JAMA*. 1910; 54: 14-18.
46. Zappala A. Estudo anatômico da divisão terminal da artéria lienal [Tese-Docência Livre]. Belo Horizonte(MG): Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; 1958.
47. Neder AM. Estudo anatômico das zonas venosas lienais e sua drenagem no homem [Tese-Doutorado]. Belo Horizonte(MG): Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; 1958.
48. Petroianu A, Ferreira VLM, Barbosa AJA. Morphology and viability of the spleen after subtotal splenectomy. *Braz J Med Biol Res*. 1989; 22(4): 491-5.
49. Petroianu A, Simal CJR, Barbosa AJA. Splenic macrophage phagocytic function after subtotal splenectomy in the dog. *Med Sci Res*. 1992; 20:127-8.
50. Paulo ICAL. Níveis de lípides plasmáticos em ratos submetidos à esplenectomia total, ligadura simultânea da artéria e veias esplênicas e à esplenectomia subtotal com preservação do pólo inferior [Tese – Mestrado]. Belo Horizonte(MG): Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; 2004.
51. Poulin EC, Thibault C, DesCôteaux JG, Gôté G. Partial laparoscopic splenectomy for trauma: technique and case report. *Surg Laparosc Endosc*. 1995; 5(4): 306-10.
52. Berindoague RN. Esplenectomia subtotal laparoscópica no cão [Tese-Mestrado]. Belo Horizonte(MG): Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; 2002.
53. Brettschneider L, Dalozze PM, Huguet C, Porter KA, Groth CG, Hutchison DE, *et al*. The use of combined preservation techniques for extended storage of orthotopic liver homografts. *Surg Gynecol Obstet*. 1968; 126(2): 263-74.
54. Burk RF, Reiter R, Lane JM. Hyperbaric oxygen protection against carbon tetrachloride hypertoxicity in the rat. Association with altered metabolism. *Gastroenterology*. 1986; 90(4): 812-8.

55. Mazariegos GV, O'Toole K, Mieles LA, Dvorchik I, Meza MP, Briassoulis G, *et al.* Hyperbaric oxygen therapy for hepatic artery thrombosis after liver transplantation in children. *Liver Transpl Surg.* 1999; 5(5): 429-36.
56. Uwagawa T, Unemura Y, Yamazaki Y. Hyperbaric oxygenation after portal vein embolization for regeneration of the predicted remnant liver. *J Surg Res.* 2001; 100(1): 63-8.
57. Chen MF, Chen HM, Ueng SW, Shyr MH. Hyperbaric oxygen pretreatment attenuates hepatic reperfusion injury. *Liver.* 1998; 18(2): 110-6.
58. Ministério da Defesa (BR). Diretoria de Ensino da Marinha – DENSM-300. Manual Didático. Medicina Submarina. Rio de Janeiro (RJ): Marinha do Brasil; 1976.
59. Lacerda EP, Sitnoveter EL, Alcantara LM, Leite JL, Trevizan MA, Mendes IAC. Atuação da enfermagem no tratamento com oxigenoterapia hiperbárica. *Rev Latino-am Enfermagem.* 2006; 14(1): 118-23.
60. Caixeta MAF. Manual de oxigenoterapia hiperbárica. Rio de Janeiro (RJ): Marinha do Brasil; 2003.
61. Conselho Federal de Medicina. Resolução nº1457 de 15 de setembro de 1995. Conselho Federal de Medicina. Diário Oficial da união. Brasília, 19 de setembro de 1995.
62. Sociedade Brasileira de Medicina Hiperbárica. Diretrizes de Segurança e Qualidade. In: Fórum de Segurança e Qualidade em Medicina Hiperbárica. São Paulo, outubro de 2003. São Paulo (SP): Sociedade Brasileira de Medicina Hiperbárica – SBMH; 2003.
63. Rodrigues Jr M, & Marra AR. Quando indicar a oxigenoterapia hiperbárica? *Rev Assoc Med Bras.* 2004; 50(3): 240.
64. Wallace DJ, Silverman S, Goldstein J, Hughes D. Use of hyperbaric oxygen in rheumatic diseases: case report and critical analysis. *Lupus.* 1995; 4(3): 172-5.
65. Mas N, Isik AT, Mas MR, Comert B, Tasci I, Deveci S, *et al.* Hyperbaric oxygen - induced changes in bacterial translocation and acinar ultrastructure in rat acute necrotizing pancreatitis. *J Gastroenterol.* 2005; 40(10): 980-6.
66. Akin ML, Gulluoglu BM, Uluutku H, Erenoglu C, Elbuken E, Yildirim S, *et al.* Hyperbaric oxygen improves healing in experimental rat colitis. *Undersea Hyperb Med.* 2002; 29(4): 279-85.
67. Rachmilewitz D, Karmeli F, Okon E, Rubenstein I, Better OS. Hyperbaric oxygen: a novel modality to ameliorate experimental colitis. *Gut.* 1998; 43(4): 512-8.

68. Liu W, Zhao W, Lu X, Zheng X, Luo C. Clinical pathological study of treatment of chronic hepatitis with hyperbaric oxygenation. *Chin Med J*. 2002; 115(8): 1153-7.
69. Kudchodkar BJ, Wilson J, Lacko A, Dory L. Hyperbaric oxygen reduces the progression and accelerates the regression of atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000; 20(6): 1637-43.
70. Edwards RJ, Im MJ, Hoopes JE. Effects of hyperbaric oxygen preservation on rat limb replantation: a preliminary report. *Ann Plast Surg*. 1991; 27(1): 31-5.
71. Mantovani M, Iazetti PE, Rizoli SB, Capone Neto A, Basile Filho A, Leonardo LS. Efeitos da oxigenoterapia hiperbárica na peritonite fecal experimental. *Rev Col Bras Cir*. 1989; 16(2): 84-6.
72. Tokar B, Gundogan AH, Ilhan H, Bildirici K, Gultepe M, Elbuken E. The effect of hyperbaric oxygen treatment on the inflammatory changes caused by intraperitoneal meconium. *Pediatr Surg Int*. 2003; 19(9-10): 673-6.
73. Luongo C, Imperatore F, Cuzzocrea S, Filipelli A, Scafuro MA, Mangoni G, *et al*. Effects of hyperbaric oxygen exposure on a zymosan-induced shock model. *Crit Care Med*. 1998; 26(12): 1972-6.
74. Yamada T, Taguchi T, Hirata Y, Suita S, Yagi H. The protective effect of hyperbaric oxygenation on the small intestine in ischemia-reperfusion injury. *J Pediatr Surg*. 1995; 30(6): 786-90.
75. Yu SY, Chiu JH, Yang SD, Yu HY, Hsieh CC, Chen PJ. Preconditioned hyperbaric oxygenation protects the liver against ischemia-reperfusion injury in rats. *J Surg Res*. 2005; 128(1): 28-36.
76. Kim CH, Choi H, Chun YS, Kim GT, Park JW, Kim MS. Hyperbaric oxygenation pretreatment induces catalase and reduces infarct size in ischemic rat myocardium. *Pflugers Arch*. 2001; 442(4): 519-25.
77. Tolentino EC, Castro e Silva O, Zucoloto S, Souza ME, Gomes MC, Sankarankutty AK, *et al*. Effect of hyperbaric oxygen on liver regeneration in a rat model. *Transplant Proc*. 2006; 38(6): 1947-52.
78. Paulo DNS, Kalil M, Grillo Júnior LSP, Borges EB, Cintra LC, Pereira FEL, Lázaro da Silva A. Viabilidade do baço após a ligadura dos vasos esplênicos: efeito do tratamento com oxigênio hiperbárico. *Rev Assoc Med Bras*. 2005; 51(1): 46-50.
79. Andersen ML, D'Almeida V, Ko GM, Kawakami R, Martins PJF, Magalhães LM, *et al*. Procedimentos Experimentais. In: *Princípios Éticos e Práticos do uso de Animais de Experimentação*. São Paulo: CLR Balieiro Editores. 2004; 46-69.

80. Alvarez SR, Escalante CF, Ritverto DC, *et al.* Assessment of partial splenectomy in residual splenic function. *Int Surg* 1987; 72:149-55.
81. Witte CL, Esser MJ, Rappaport WD. Updating the management of salvageable splenic injury. *Ann Surg.* 1992; 215(3):261-5.
82. Bradshaw PH, & Thomas CG Jr. Regeneration of splenic remnants after partial splenectomy in rats. *J Surg Res.* 1982; 32(2): 176-81.
83. Van Wyck DB, Witte MH, Witte CL, Thies AC Jr. Critical splenic mass for survival from experimental pneumococemia. *J Surg Res.* 1980; 28(1): 14-7.
84. Rezende AB, Nunes SI, Farias RE, Vieira FR, Petroianu A, Teixeira HC. Influência do baço, da asplenia e do implante esplênico autógeno no metabolismo lipídico de camundongos. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2007; 34(3): 177-182.

ANEXO E APÊNDICE

Anexo A – Parecer ético



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

CERTIFICADO

Certificamos que o **Protocolo nº 4/2008**, relativo ao projeto intitulado "**Efeito da oxigenoterapia hiperbárica no crescimento do pólo inferior remanescente da esplenectomia subtotal em ratos**", que tem como responsável(is) **Alcino Lázaro da Silva**, está(ão) de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo **Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA/UFMG)**, tendo sido aprovado na reunião de **14/ 05/2008**.

Este certificado expira-se em **14/ 05/ 2013**.

CERTIFICATE

We hereby certify that the **Protocol nº 4/2008**, related to the project entitled "**Effect of hyperbaric oxygen therapy in growth of the lower spleen pole remaining of subtotal splenectomy in rats**", under the supervisors of **Alcino Lázaro da Silva**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation (CETEA/UFMG)**, and was approved in **May 14, 2008**.

This certificate expires in **May 14, 2013**.

Belo Horizonte, 23 de Maio de 2008.

Prof. Humberto Pereira Oliveira
Coordenador do CETEA/UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 - Belo Horizonte, MG - Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592
www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpg.ufmg.br

Apêndice A - Ficha de anotação dos dados do experimento

Título do Projeto: “Efeito da oxigenoterapia hiperbárica em ratos submetidos à esplenectomia subtotal com preservação do polo inferior”

Autor (a): Marcela Souza Lima Paulo

Orientadores: Tarcizo Afonso Nunes e Danilo Nagib Salomão Paulo

GRUPO A – não tratados com OHB

15º dia () 45º dia ()

GRUPO B – tratados com OHB

15º dia () 45º dia ()

Identificação: _____

Peso do rato (g): _____

Data da operação: _____

Peso do rato 10º dia (g): _____

Horário da operação: _____

1ª Cirurgia – DIA 0 (zero)

- **Porção superior (controle)**

	Porção superior do baço (retirada)
Peso (mg)	
Comprimento (mm)	
Largura (mm)	
Espessura (mm)	

- **Polo inferior remanescente**

Comprimento (mm): _____

Largura (mm): _____

Espessura (mm): _____

Evolução pós-operatória: óbito () Sobrevivência () Em caso de óbito, qual foi a causa provável? _____

Em caso de sobrevivência o animal será eutanasiado no 15º dia ou 45º dia para estudo definitivo.

2ª Cirurgia (após eutanásia) – DIA 15 () 45 ()

Data da operação: _____ Peso do rato (g): _____

Horário da operação: _____

• **Polo inferior remanescente (após eutanásia)**

	Polo inferior remanescente
Peso (mg)	
Comprimento (mm)	
Largura (mm)	
Espessura (mm)	

- Todo o material do baço será enviado para exame histológico, imunoistoquímico (IHQ) e genética molecular.