

Universidade Federal de Juiz de Fora
Instituto de Ciências Biológicas

SABRINE TEIXEIRA FERRAZ GRÜNEWALD

**AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO IMPLANTE ESPLÊNICO
AUTÓGENO E SUA RELAÇÃO COM A HISTOLOGIA HEPÁTICA EM
UM MODELO MURINO DE INJÚRIA POR PARACETAMOL**

Juiz de Fora, 2015

SABRINE TEIXEIRA FERRAZ GRÜNEWALD

**AVALIAÇÃO MORFOFUNCIONAL DO IMPLANTE ESPLÊNICO
AUTÓGENO E SUA RELAÇÃO COM A HISTOLOGIA HEPÁTICA EM
UM MODELO MURINO DE INJÚRIA POR PARACETAMOL**

**Dissertação de Mestrado do Curso de
Pós-Graduação em Ciências
Biológicas, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas na área
de Imunologia.**

**Orientador: Prof. Dr. Henrique Couto Teixeira
Co-orientador: Prof.^a Dr.^a Alice Belleigoli Rezende**

Juiz de Fora, 2015

“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde os outros já foram.”

(Alexander Graham Bell)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Juiz de Fora, e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, pela oportunidade de crescimento pessoal e profissional.

Ao meu marido Thiago, por seu apoio e paciência constantes e na certeza de sua torcida sempre pelo melhor, mesmo à distância.

À minha família, por seus bons pensamentos, e especialmente a minha mãe Edneia, por seu investimento em minha educação durante toda a minha vida.

Ao meu orientador Henrique, por sua confiança, suas boas ideias e sua colaboração intelectual nessa parceria.

A minha co-orientadora Alice, por sua grande ajuda e disponibilidade, e principalmente por ser uma fonte de calma nos momentos de maior ansiedade.

Aos amigos Ana Carolina, Bárbara, Caroline e Erick, que tanto me ajudaram no cuidado com os animais do experimento.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia da UFJF, que tão bem me receberam, sempre dispostos a ajudar. Tenham a certeza de que todos foram muito importantes!

Aos colegas do Departamento Materno-Infantil e do Serviço de Pediatria, que além da torcida pelo sucesso foram responsáveis por me ajudar com “o outro lado” da minha vida profissional.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram para a construção desse trabalho.

RESUMO

O baço apresenta várias funções, como fagocitose de microrganismos, produção de imunoglobulinas e filtração do sangue. O baço também possui relação anatômica e funcional com o fígado, embora existam poucas pesquisas sobre esse aspecto. O modelo da esplenectomia seguida de implante esplênico autógeno é baseado na capacidade regenerativa do baço, sendo utilizado para estudo de suas funções. Já o modelo da injúria hepática química consiste na indução de lesão hepatocelular para avaliação da função hepática. O objetivo desse trabalho foi avaliar a função de filtração do baço no modelo de implante autógeno, e estudar sua relação funcional com o fígado no modelo de injúria hepática química. Cinquenta e dois camundongos BALB/C fêmeas foram randomizados nos grupos: operação simulada, esplenectomia total, esplenectomia e implante autógeno do baço em omento maior, e grupo controle. Após 7, 14 e 28 dias da cirurgia, a filtração esplênica foi avaliada com a contagem de corpúsculos de Howell-Jolly e eritrócitos com indentações. No 28º dia, os animais receberam paracetamol 400mg/kg por gavagem, sendo eutanasiados após 12 ou 24 horas. Realizou-se dosagem de transaminases hepáticas, e avaliação histológica do fígado e baço. Quanto a função de filtração, o grupo esplenectomizado demonstrou filtração insuficiente em todas as análises, enquanto o grupo do implante autógeno evoluiu com recuperação progressiva da função após o 14º dia. A avaliação histológica dos implantes mostrou, no 28º dia após a cirurgia, aspecto morfológico similar ao baço normal. A dosagem de transaminases após a injúria medicamentosa não permitiu uma definição quanto a influência do baço sobre as mesmas. A histopatologia hepática mostrou agravamento temporal da lesão, com necrose centrolobular mais intensa no grupo esplenectomizado que nos demais, sugerindo um papel protetor do baço nesse modelo de injúria. Assim, os implantes esplênicos apresentaram recuperação estrutural e funcional, demonstrando a capacidade do implante autógeno de resgatar a função de filtração do baço íntegro. De forma inédita, foi demonstrado que a integridade da função esplênica pode estar associada à função hepática, uma vez que a presença do baço ou do implante esplênico amenizou os efeitos da lesão hepática induzida quimicamente.

Palavras-chave: baço; esplenectomia; paracetamol; fígado; falência hepática aguda

ABSTRACT

The spleen presents various functions such as phagocytosis of microorganisms, production of immunoglobulins, and blood filtration. The spleen has also an anatomical and functional relationship with the liver, although there are few studies on this topic. The model of splenectomy and autogenous implant of splenic tissue is based on the regenerative capacity of the spleen, being useful to study their functions. The chemical liver injury model consists of the induction of hepatocellular injury for assessment of liver function. The aim of this study was to assess the spleen filtering function of the splenic model, and to evaluate their functional relationship with the liver on the chemical liver injury model. Fifty-two BALB/C mice were randomized into groups: sham operated, total splenectomy, splenectomy and autologous implant of the spleen in the greater omentum, and control. After 7, 14 and 28 days after surgery, splenic filtration was assessed by counting Howell-Jolly corpuscles and erythrocytes with indentations. On day 28, animals received paracetamol at 400mg/kg by gavage and were euthanized after 12 or 24 hours for dosage of liver transaminases and histology of liver and spleen. Regarding the filtering function, the splenectomized group demonstrated insufficient filtration in all analyzes, while the autologous implant group developed progressive recovery of function after the 14th day. Histology of the implants showed, on the 28th day after surgery, morphological similarity to the normal spleen. The assessment of transaminases after drug injury did not allow a definition as to the influence of the spleen on liver function. Liver histology evaluation showed an exacerbation of the injury with time, with more intense centrilobular necrosis in the splenectomized group than in the other, suggesting a protective role of the spleen in liver injury model. Thus, splenic implants showed structural and functional recovery, demonstrating the ability of the autologous implant to revive the filtering function of the intact spleen. Furthermore, the integrity of splenic function may be associated with liver function, since the presence of the spleen or spleen implantation mitigated the effects of chemically induced liver injury.

Keywords: spleen; splenectomy; acetaminophen; liver; liver failure.

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1: Histologia hepática.....	22
Tabela 1: Grupos experimentais.....	28
Figura 2: Imagens ilustrativas da técnica cirúrgica utilizada para o grupo submetido a esplenectomia e implante esplênico.....	29
Figura 3: Técnicas hematológicas utilizadas para avaliação da função de filtração do baço.....	31
Figura 4: Escala visual para avaliação de hemólise e integridade da amostra.....	32
Tabela 2: Escore de pontuação da histopatologia hepática.....	35
Figura 5: Delineamento experimental.....	36
Tabela 3: Dados de peso e tempo de cirurgia médios nos grupos experimentais.....	37
Figura 6: Contagens de corpúsculos de Howell-Jolly e eritrócitos com indentações para os três grupos experimentais, com 7, 14 e 28 dias da intervenção cirúrgica.....	38
Figura 7: Gráficos de dispersão de pontos para avaliação de sensibilidade e especificidades técnicas hematológicas utilizadas.....	39
Figura 8: Imagem ilustrativa da avaliação histológica esplênica 28 dias após a intervenção cirúrgica.....	40
Figura 9: Avaliação das transaminases hepáticas após a injúria hepática medicamentosa. Gráficos representativos dos valores de alanina aminotransferase e aspartato aminotransferase, em 12 e 24 horas após a indução de lesão hepática, para os diferentes grupos de tratamento.....	41
Figura 10: Imagem representativa da histopatologia hepática frente a injúria por paracetamol.....	43
Figura 11: Imagem representativa da histopatologia hepática nos grupos experimentais, após 12 e 24 horas da injúria induzida por paracetamol, com destaque para as regiões centrolobulares.....	44

Figura 12: Imagem representativa de alterações adicionais observadas na histopatologia hepática no grupo esplenectomia total com 24 horas da injúria provocada por paracetamol.....**45**

Figura 13: Pontuação no escore de avaliação das alterações histológicas hepáticas, para cada grupo experimental e nos diferentes tempos de análise.....**46**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC – animais de controle

ALT – alanina aminotransferase

AST – aspartato aminotransferase

ATP – adenosina tri-fosfato

CHJ – corpúsculos de Howell-Jolly

DAMPs – “damage-associated molecular patterns” – padrões moleculares associados a dano

DNA – ácido desoxirribonucleico

EI – eritrócitos com indentações

ET – esplenectomia total

HDL – “high-density lipoprotein” – lipoproteína de alta densidade

HE – hematoxilina-eosina

LDL – “low-density lipoprotein” – lipoproteína de baixa densidade

NAPQUI – N-acetil parabenzoquinoneimina

NK – “natural killer”

OM – omento maior

OS – operação simulada

RPM – rotações por minuto

SIGNR1 – receptor de lecitina tipo C

TGF – “transforming growth factor” – fator de crescimento transformante

TLR – “toll-like receptor” – receptor semelhante a toll

UV – ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 O BAÇO E A TÉCNICA DE IMPLANTE ESPLÊNICO AUTÓGENO.....	13
1.2 O FÍGADO E OS MODELOS DE INJÚRIA HEPÁTICA.....	20
1.3 JUSTIFICATIVA.....	24
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL.....	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3 MATERIAL e MÉTODOS	27
3.1 ANIMAIS.....	27
3.2 ANESTESIA E INTERVENÇÃO CIRÚRGICA.....	28
3.3 COLETA DE SANGUE.....	29
3.4 CONTAGEM DE CORPÚSCULOS DE HOWELL-JOLLY.....	30
3.5 CONTAGEM DE ERITRÓCITOS COM INDENTAÇÕES (“PITTED CELLS”).....	30
3.6 INJÚRIA HEPÁTICA MEDICAMENTOSA.....	31
3.7 AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE TRANSAMINASES.....	31
3.8 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO.....	33
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
3.10 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	36
4 RESULTADOS	37
4.1 CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	37
4.2 AVALIAÇÃO DA FUNÇÃO DE FILTRAÇÃO DO BAÇO.....	37
4.3 AVALIAÇÃO DA HISTOLOGIA DOS IMPLANTES ESPLÊNICOS.....	39
4.4 AVALIAÇÃO DAS TRANSAMINASES HEPÁTICAS APÓS INJÚRIA POR PARACETAMOL.....	40

4.5 AVALIAÇÃO DA HISTOLOGIA HEPÁTICA APÓS INJÚRIA POR PARACETAMOL.....	42
5 DISCUSSÃO	47
6 CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ANEXOS.....	63

1 INTRODUÇÃO

1.1 O baço e a técnica de implante esplênico autógeno

Desde os primeiros registros históricos do exercício da medicina, o baço vem sendo considerado um órgão misterioso e fascinante. O conhecimento documentado mais antigo sobre o baço é proveniente da medicina tradicional chinesa, que atribuía ao órgão as funções de defesa do organismo, fornecimento de energia e digestão (PETROIANU, 2003). Escritos antigos da Babilônia, Egito, Roma e Grécia implicavam o baço na capacidade atlética, e sugeriam poções e até mesmo cauterização do órgão para melhora do desempenho físico (WILKINS, 2002). Em 200 a.C., Galeno o descreveu como um órgão subsidiário do fígado, que produzia a bile negra para evitar que o sangue se contaminasse por resíduos tóxicos provenientes da alimentação.

No século XVII, o baço passou a ser relacionado à melancolia e a variações de humor (PETROIANU, 2003). Paralelamente, estudos anatômicos traziam um melhor entendimento de sua estrutura vascular e uma descrição rudimentar do que hoje sabemos serem os folículos linfóides (WILKINS, 2002). Somente nos séculos XIX e XX as funções esplênicas começaram a ser melhor compreendidas, a partir da constatação da existência das polpas vermelha e branca, e da descrição da remoção de eritrócitos senescentes da circulação sanguínea. Patologias que cursavam com esplenomegalia, como a Doença de Gaucher, a síndrome de Felty e o hiperesplenismo secundário a doenças hematológicas e infecciosas foram então descritas (WILKINS, 2002). As esplenectomias começaram a ser realizadas para tratar essas patologias, e somente em meados do século XX começou-se a perceber um maior risco de sepse em pacientes esplenectomizados (KING e SHUMACKER, 1952). No Brasil, destacam-se trabalhos do final da década de 1950, que procuraram esclarecer importantes aspectos anatômicos do baço e introduziram no país a técnica da esplenectomia parcial, dado o reconhecimento dos prejuízos inerentes a uma esplenectomia total (NEDER, 1958; ZAPALLA, 1958; CAMPOS-CHRISTO, 1959).

Embora hoje a estrutura e as funções do baço sejam melhor conhecidas, as pesquisas ainda revelam características morfofuncionais inéditas. Em termos embriológicos, o baço surge de uma condensação de células mesodérmicas, e,

durante a vida fetal, é um importante sítio de hematopoiese (PETROIANU, 2003). Sua anatomia é extremamente sofisticada, e ainda se sabe pouco sobre os processos específicos que levam a sua diferenciação e à formação de uma microarquitetura complexa que permite a interação entre células mesenquimais, hematopoiéticas e endoteliais (TARANTINO, 2011).

O baço é envolvido por uma cápsula de tecido conjuntivo denso, da qual se estendem trabéculas que subdividem o parênquima esplênico em compartimentos que se comunicam (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013). Ele pode ser dividido em três subunidades anatômicas: (1) a polpa branca, mais central, onde localizam-se folículos contendo linfócitos B e T; (2) a polpa vermelha, onde os eritrócitos são filtrados da circulação ao ficarem presos nos cordões esplênicos; e (3) a zona marginal, circundante da polpa branca, que contém macrófagos especializados e células B de memória (PETROIANU, 2003; LAMMERS *et al.*, 2012). Em adição, as artérias que irrigam o parênquima esplênico são envolvidas por uma camada de linfócitos, chamada de bainha periarteriolar, que é parte da polpa branca. Essa bainha se torna mais espessa em vários pontos do trajeto, dando origem a nódulos linfáticos, na medida em que a artéria se ramifica (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013).

Duas teorias explicam a microcirculação esplênica. Na teoria da circulação fechada, postula-se que o endotélio dos capilares arteriais terminais é contínuo com o endotélio dos seios venosos (PETROIANU, 2003). Na teoria da circulação aberta, os capilares arteriais terminariam antes de alcançarem os seios venosos, e o sangue seria lançado para os espaços intercelulares da polpa vermelha antes de retornar para os seios venosos (MEBIUS e KRAAL, 2005). Alguns autores sugerem que ambas as formas de microcirculação podem estar presentes, mas a teoria da circulação aberta é a mais aceita. Durante a passagem pelos cordões esplênicos, as células sanguíneas estariam, portanto, expostas a ação dos macrófagos, que removeriam as células senescentes ou defeituosas da circulação (PETROIANU, 2003). Além disso, eritrócitos senescentes ou com membrana citoplasmática defeituosa apresentam uma perda de deformabilidade, o que dificulta sua passagem pelos espaços interendoteliais e o seu retorno a circulação nos seios venosos, ficando represados para serem fagocitados (MEBIUS e KRAAL, 2005).

O baço é o maior órgão linfóide do organismo, e uma de suas principais funções é a fagocitose de microrganismos e a produção de imunoglobulinas,

destacando-se na defesa contra infecções (MARQUES e PETROIANU, 2003a). Na zona marginal, ocorrem manifestações da imunidade inata e adaptativa. Os macrófagos dessa região expressam receptores capazes de reconhecer antígenos de microrganismos, como os receptores semelhantes a Toll (*Toll-like receptors* – TLR), SIGNR1 (receptor de lecitina tipo C) e MARCO (receptor de macrófagos com estrutura colágena) (MEBIUS e KRAAL, 2005). Após o reconhecimento, os patógenos são fagocitados e seus produtos de degradação ativam os linfócitos B e células dendríticas da zona marginal, dando início a uma resposta adaptativa, que ocorre prioritariamente na polpa branca (MEBIUS e KRAAL, 2005). Na polpa branca, as células apresentadoras de antígenos entram em contato com linfócitos T e B, alterando a expressão de receptores e ativando-os. Esse contato permite que as células B possam deixar a polpa branca e se direcionar para outros órgãos linfoides (MEBIUS e KRAAL, 2005; MARQUES e PETROIANU, 2003a). A resposta humoral através da produção de imunoglobulinas ocorre precocemente no baço, induzida pela fagocitose dos patógenos. A união entre essas duas funções imunológicas – depuração de bactérias e produção de imunoglobulinas – torna o baço um importante órgão na resposta contra bacteremias (MARQUES e PETROIANU, 2003a).

Dessa forma, pacientes submetidos à esplenectomia estão sob maior risco de desenvolver infecções graves ou fulminantes por microrganismos encapsulados como *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae*, e *Staphylococcus*, cuja eliminação é essencialmente dependente de opsonização e fagocitose (MARQUES e PETROIANU, 2003b; MIKO *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2010). A incidência é ainda maior em indivíduos jovens, portadores de doenças malignas, imunodeprimidos, ou nos primeiros dois anos após a cirurgia (CHAUFFAILLE, 2002; RESENDE e PETROIANU, 2003). A mortalidade por sepse após esplenectomia pode chegar a 80% (LAMMERS *et al.*, 2012).

Em adição, o parênquima esplênico também é responsável pela filtração do sangue, promovendo a retirada de eritrócitos senescentes ou anormais, removendo partículas coloidais e materiais estranhos ao organismo, reciclando o ferro utilizado na formação da hemoglobina, e removendo parasitas intra-eritrocitários (SCHNITZER *et al.*, 1972; MEBIUS e KRAAL, 2005). Eritrócitos com inclusões citoplasmáticas – como os corpúsculos de Howell-Jolly, grânulos sideróticos,

corpúsculos de Heinz, e vacúolos – são represados nos cordões esplênicos, onde podem sofrer a remoção seletiva dessas inclusões e retornar à circulação sanguínea (PETROIANU, 2003, MARQUES e PETROIANU, 2003a). Além disso, eritrócitos senescentes ou com defeitos de membrana são represados e fagocitados pelos macrófagos esplênicos, sendo removidos em definitivo da circulação. Os macrófagos realizam a proteólise da hemoglobina, catabolizando o grupo heme em biliverdina e íons ferrosos, que são armazenados ou transportados para a medula óssea para serem reciclados na produção de novos eritrócitos (MEBIUS e KRAAL, 2005). Pacientes esplenectomizados possuem, portanto, maior viscosidade sanguínea, alteração na deformabilidade eritrocitária, maior risco de eventos trombóticos e de gravidade em infecções por parasitas intra-eritrocitários, como o *Plasmodium* e a *Babesia* (MIKO *et al.*, 2001; MIKO *et al.*, 2003; LAMMERS *et al.*, 2012).

Duas observações sugerem ainda que o baço teria um papel no metabolismo lipídico. Pacientes portadores de policitemia vera ou doenças mieloproliferativas que cursam com hiperesplenismo apresentam redução dos valores de colesterol total, colesterol HDL, apolipoproteína B e A-1 (PETROIANU *et al.*, 2006). Já pacientes submetidos a esplenectomia apresentam um maior risco de hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia (ALBERTI *et al.*, 2012). Em modelos experimentais, foi evidenciada uma aceleração do processo aterosclerótico em camundongos esplenectomizados (REZENDE *et al.*, 2011). No entanto, o mecanismo fisiopatológico dessas alterações ainda não está bem estabelecido. Acredita-se que os macrófagos esplênicos possam atuar como reservatórios lipídicos, participando da depuração plasmática de lipoproteínas LDL e HDL, mas mais estudos sobre o tema ainda se fazem necessários (PETROIANU *et al.*, 2006).

O baço é um dos órgãos mais frequentemente lesados no trauma abdominal, e a gravidade da situação clínica ou a experiência limitada de alguns cirurgiões geralmente resulta na retirada de todo o órgão (RESENDE, PETROIANU e JUNIOR, 2002). Porém, em serviços de referência para tratamento do trauma, muitas das lesões esplênicas que antigamente eram tratadas com esplenectomia total, hoje são abordadas de forma conservadora, através de técnicas como aplicação de agentes hemostáticos, esplenorrafia e esplenectomia parcial (RESENDE e PETROIANU, 2003; PAULO *et al.*, 2010; REZENDE *et al.*, 2011). Para lesões esplênicas grau IV e V, no entanto, a esplenectomia total ainda é a única opção terapêutica o tratamento

disponível (RESENDE e PETROIANU, 2003; KESTERING *et al.*, 2005; PAULO *et al.*, 2010). Nesses casos, o implante autógeno do baço pode ser uma alternativa viável para a preservação de parênquima esplênico (PAULO *et al.*, 2010; SOUSA, 2011). Essa técnica surgiu após a observação da regeneração morfológica e funcional espontânea do baço a partir de implantes esplênicos, em um processo denominado esplenose (MARQUES *et al.*, 2012; SOUSA, 2011).

O modelo experimental de implante autógeno do baço vem sendo estudado desde 1930 (PETROIANU, 2003). Nessa técnica, o baço é implantado, total ou parcialmente, sobre outra estrutura da cavidade abdominal. O parênquima esplênico passa inicialmente por um processo de necrose quase completa, e posteriormente inicia sua regeneração a partir das camadas mais periféricas em direção ao centro (MARQUES *et al.*, 2002; SOUSA, 2011). Esse processo de regeneração, no entanto, ocorre em tempos variáveis entre as espécies (MARQUES *et al.*, 2014). Em ratos, por exemplo, a partir de cinco semanas já são observadas as polpas vermelha e branca; com 8 semanas os folículos linfóides podem ser visualizados, e a partir de 90 dias a estrutura já possui a organização de um baço normal (FREITAS *et al.*, 2010). Já em camundongos, uma arquitetura esplênica semelhante à de um baço normal já pode ser observada com aproximadamente 30 dias do implante (NUNES *et al.*, 2005).

Os vasos que nutrem o baço implantado originam-se de sua regeneração e de anastomoses com capilares dos tecidos vizinhos, em um processo que se inicia a partir de 48 horas do implante autógeno (ALVES *et al.*, 1999; SOUSA, 2011). Há ainda frequente acúmulo de hemossiderina no interior de macrófagos, provavelmente originários do processo hemorrágico ao redor do sítio de implantação e da fagocitose de eritrócitos senescentes (MIKO *et al.*, 2001; MARQUES *et al.*, 2002). A presença de um implante com arquitetura intacta é necessária para que as funções de filtração e fagocitose sejam adequadamente exercidas (KESTERING *et al.*, 2005).

Diversos sítios de implante já foram descritos na literatura, como o omento maior, cavidade peritoneal, loja esplênica, retroperitônio, espaço portal, musculatura abdominal, axilas e tecido subcutâneo da parede abdominal (MARQUES *et al.*, 2002; BRAGA *et al.*, 2012). Vários estudos defendem que o omento maior é o sítio mais apropriado, por apresentar vascularização acentuada e por permanecer em território portal, o que seria essencial para uma função de filtração adequada (MIKO *et al.*,

2001; BRAGA *et al.*, 2012; MARQUES *et al.*, 2014). No entanto, a investigação posterior do implante pode ser dificultada, já que o tecido gorduroso possui textura semelhante à do baço, o que pode prejudicar a caracterização dos implantes em exames de imagem (KESTERING *et al.*, 2005). Além disso, há uma maior formação de aderências em implantes realizados em omento maior (NUNES *et al.*, 2005). Alguns estudos têm demonstrado, ainda, que o sítio do implante não afeta a resposta imune através da produção de anticorpos nem o aspecto da arquitetura tecidual (NUNES *et al.*, 2005).

Quanto ao volume a ser implantado, sabe-se que o restabelecimento da função esplênica depende da massa regenerada. Em ratos e camundongos, foi estabelecida uma massa crítica mínima de aproximadamente 25% do parênquima esplênico (MARQUES *et al.*, 2002; MARQUES *et al.*, 2012). Não é possível determinar se esse valor pode ser extrapolado para outras espécies, mas é aceitável que também haja uma massa mínima de parênquima esplênico necessária para uma função adequada em humanos.

Não existem parâmetros diretos para analisar as funções esplênicas, e, por isso, sua avaliação adequada fica bastante prejudicada (PETROIANU, 2003; RESENDE e PETROIANU, 2003). A função de filtração tem sido frequentemente avaliada através da presença de corpúsculos de Howell-Jolly (CHJ) no interior dos eritrócitos (RESENDE e PETROIANU, 2002; RESENDE e PETROIANU, 2003; SOUSA, 2011). Esses corpúsculos representam fragmentos nucleares – restos de DNA – arredondados, resultantes da desintegração do núcleo de eritroblastos ortocromáticos. Em condições fisiológicas, eles são removidos dos eritrócitos quando os mesmos passam pela circulação esplênica. Assim, a presença de corpúsculos de Howell-Jolly sugere hipoesplenismo ou asplenia, funcional ou anatômica (MARQUES e PETROIANU, 2003; RESENDE e PETROIANU, 2003). Outras inclusões eritrocitárias, como os corpúsculos de Heinz (hemoglobina desnaturada) e Pappenheimer (grânulos de ferro) também podem ser analisados com o mesmo objetivo (MARQUES e PETROIANU, 2003b; MARQUES, PETROIANU e COELHO, 2003).

Um outro sinal indicativo de hipofunção esplênica é a presença de eritrócitos com indentações (EI), também chamadas de vacúolos ou “pits”, que podem ser observadas sob microscopia de interferência ou contraste de fase (ZOLI *et al.*, 1998; PETROIANU, 2003). Estudos com microscopia eletrônica mostraram que esses

“pits” são na verdade vacúolos com cerca de 300nm de diâmetro, localizados sob a membrana plasmática (PORTO *et al.*, 2010). Essas indentações, que podem também ser avaliadas através da coloração por prata e contagem de grânulos argirófilos, indicam eritrócitos senescentes que já teriam sido removidos da circulação por um baço normal (PORTO *et al.*, 2010; PETROIANU, 2003). A fragilidade da membrana dos eritrócitos também parece ser mais elevada em indivíduos esplenectomizados, o que pode ser medido através de uma curva de fragilidade osmótica (ANSCHAU, 2011).

A avaliação da função esplênica do ponto de vista imunológico pode ser feita através da dosagem de imunoglobulinas, mas existem controvérsias na literatura quanto aos níveis de anticorpos no paciente esplenectomizado (RESENDE e PETROIANU, 2002; MARQUES e PETROIANU, 2003a). A análise da capacidade de depuração de microrganismos, demonstrada pela presença de bactérias fagocitadas em diferentes tecidos e por menor concentração de bactérias na corrente sanguínea, é um ótimo parâmetro, frequentemente utilizado em modelos experimentais (RESENDE e PETROIANU, 2002; MARQUES, PETROIANU e COELHO, 2003; TEIXEIRA *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2010).

Outra opção de avaliação funcional são os métodos de imagem. A cintilografia pode ser útil para demonstrar a captação de coloide marcado com isótopos radioativos (RESENDE e PETROIANU, 2002; PETROIANU, 2003). Essa técnica tem a vantagem de identificar detalhes anatômicos como o número, localização, volume e forma dos implantes. Entretanto, seu alto custo impede que seja realizada como forma de rastreamento da hipofunção esplênica em pacientes de risco (PORTO *et al.*, 2010). Além disso, as avaliações dos CHJ e EI possuem correlação com avaliações funcionais no baço por meio da cintilografia, sendo métodos menos custosos para o rastreamento (LAMMERS *et al.*, 2012).

O parênquima esplênico possui ainda a função de armazenamento de diversas substâncias, como metais, hemoglobina, aminoácidos e lipídeos, além de ter influência sobre algumas funções hepáticas. No entanto, ainda existem poucas pesquisas na literatura que avaliaram de maneira contundente a relação funcional desses dois órgãos (PETROIANU, 2003). Em condições fisiológicas, o sangue esplênico segue pelo sistema porta diretamente para o fígado, correspondendo a até 80% da irrigação hepática (KUGA, 2004; SILVA, 2012). Considerando a capacidade diversificada de filtração e armazenamento do baço, supõe-se que o mesmo atuaria

como protetor contra injúrias ao fígado (PETROIANU, 2003).

Dadas as inúmeras funções esplênicas destacadas, e considerando que mesmo após séculos de pesquisas sobre o órgão ainda existem diversos aspectos mal compreendidos, estudos sobre o baço são necessários para o avanço da ciência, especialmente nas áreas de imunologia, hematologia e cirurgia.

1.2 O fígado e os modelos de injúria hepática

O fígado é um órgão do sistema digestório envolvido com diversos processos de homeostase do organismo, tais como, o metabolismo e armazenamento de vitaminas, aminoácidos, lipídeos e carboidratos; síntese de proteínas, como albumina, e fatores de coagulação; e detoxicação de substâncias (BELARDINELLI, 2008). Por ser um órgão de grande importância e com funções muito variadas, estudos experimentais que versam sobre suas funcionalidades são frequentes e geralmente utilizam modelos de injúria.

Os modelos experimentais de injúria hepática podem ser divididos em cirúrgicos – com remoção crítica de massa hepática ou interrupção de sua vascularização – e químicos – através do uso de hepatotoxinas (NEWSOME *et al.*, 2000). Os modelos cirúrgicos seriam menos adequados que os químicos para o estudo da influência da função esplênica sobre a hepática, porque prejudicam a comunicação entre os órgãos via sistema porta. Dentre os modelos químicos, a injúria hepática por paracetamol (ou acetaminofeno) é um dos mais utilizados e com maior relevância clínica, visto que este é um dos analgésicos mais vendidos no mundo, e que a toxicidade por essa droga é uma das maiores causas da insuficiência hepática aguda (SANTOS, 2012; SANZ-GARCIA *et al.*, 2013). Além disso, é um modelo com características de reprodutibilidade, custo reduzido e baixo risco para o pesquisador (BELARDINELLI, 2008; SANTOS, 2012). Embora o modelo de injúria por paracetamol venha sendo estudado há mais de 40 anos, muitos aspectos sobre a morte celular provocada precisam ser melhor caracterizados (JAESCHKE *et al.*, 2011).

A toxicidade hepática pelo paracetamol acontece, em altas doses, quando as vias metabólicas habituais de depuração do paracetamol ficam saturadas, e ele passa a ser metabolizado pelo citocromo P450. Essa via alternativa leva a produção de um metabólito tóxico, a N-acetil parabenzoquinoneimina (NAPQUI). A NAPQUI, por sua vez, pode ser detoxificada pela glutatona, mas, uma vez que esse sistema

também estiver saturado pela superdosagem, ocorrerá lesão hepática (NEWSOME *et al.*, 2000; JAMES, MAYEUX e HINSON, 2003). A NAPQUI também se liga a proteínas celulares causando sua inativação, e é capaz de levar a disfunção mitocondrial, com abertura de poros de permeabilidade mitocondriais, lesão do DNA celular pelas endonucleases dessa organela, e interrupção da síntese de ATP pela célula (MOHAR *et al.*, 2014; WILLIAMS *et al.*, 2014). Além de induzir a lesão hepatocelular direta, esse processo culmina com a eliminação de padrões moleculares associados a dano (DAMPs) na circulação, levando a uma resposta inflamatória estéril com liberação de citocinas e recrutamento de células da resposta imune inata para o fígado (WILLIAMS *et al.*, 2014).

Esse processo de intoxicação pode resultar em um quadro de insuficiência hepática fulminante, uma síndrome caracterizada pela rápida perda das funções hepáticas com graves consequências sistêmicas, incluindo coagulopatia, encefalopatia, coma, hipoglicemia, insuficiência renal, e falência de múltiplos órgãos e sistemas (BELARDINELLI, 2008; SANTOS, 2012). Essas alterações podem ser observadas tanto em modelos experimentais quanto em situações clínicas reais de intoxicação de animais e humanos, podendo ser fatais se o tratamento adequado não for instituído precocemente.

A histologia hepática é caracterizada por uma organização em lóbulos, de forma similar a um hexágono, com 1 a 2 mm de diâmetro (Figura 2). Em cada vértice desse hexágono localiza-se o espaço porta, composto por um ramo da veia porta, um ramo da artéria hepática e um ramo de um ducto biliar. Os hepatócitos se dispõem em cordões, intercalados por capilares sinusoides, em direção ao centro do hexágono, onde está localizada a veia centrolobular ou veia hepática terminal (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013). Os hepatócitos vizinhos da veia hepática terminal são chamados de centrolobulares, e aqueles próximos a tríade portal são chamados de periportais. A circulação sanguínea ocorre de forma centrípeta, ou seja, o sangue entra pelos ramos da veia porta e da artéria hepática, flui pelos sinusoides em direção ao centro do lóbulo, e é drenado pela veia centrolobular através de múltiplos orifícios em sua parede. Os hepatócitos são, portanto, banhados de ambos os lados por sangue venoso e arterial, sendo uma das células mais ricamente perfundidas do corpo (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013).

De forma alternativa, os lóbulos hepáticos também podem ser organizados didaticamente em zonas concêntricas, sendo a zona 1 (periportal) aquela mais

próxima ao espaço porta, e por isso mais oxigenada; a zona 2 (mediolobular), de localização intermediária; e a zona 3 (centrolobular), mais próxima às veias hepáticas terminais, e, portanto, menos oxigenada (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013).

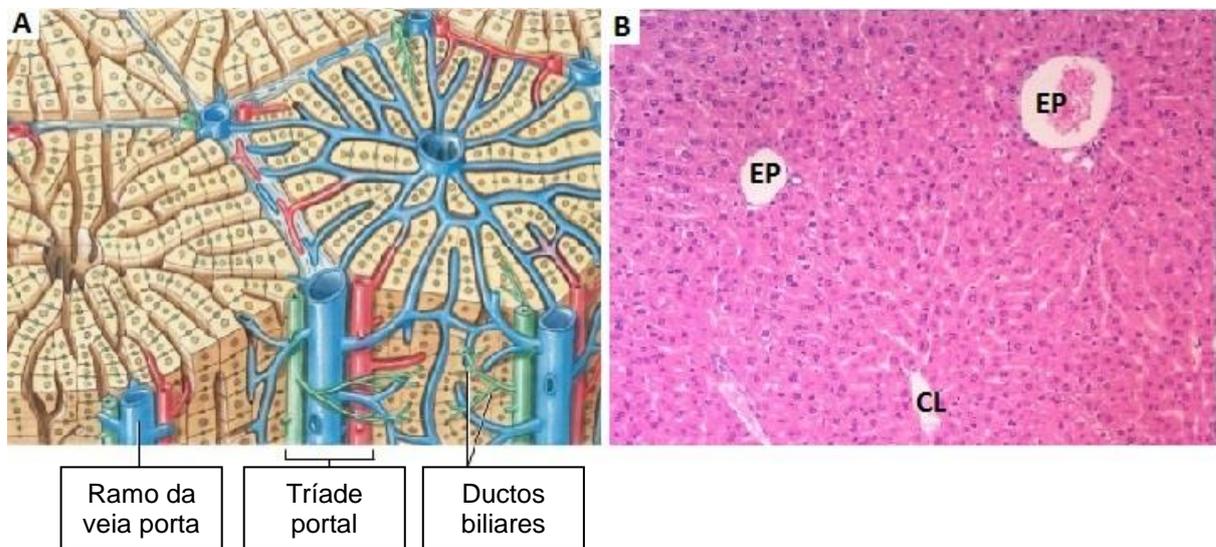


Figura 1: Histologia hepática. (A) Representação esquemática dos lóbulos hepáticos hexagonais com a tríade portal em seus vértices e a veia centrolobular ao centro (Adaptado de: MARTINI, TIMMONS e TALLITSCH, 2012). (B) Imagem representativa da histologia hepática normal exibindo dois espaços porta (EP) e uma veia centrolobular (CL), no aumento de 100x.

O fígado também possui em seu parênquima as células de Kupffer, que são macrófagos localizados na parede dos sinusoides, com funções como metabolismo de eritrócitos senescentes, degradação da hemoglobina, e fagocitose de microrganismos que eventualmente penetrem o sangue portal (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2013).

Na intoxicação por paracetamol, a lesão hepática causada pela NAPQI caracteriza-se por degeneração hidrópica dos hepatócitos (balonização), necrose predominantemente centrolobular, e graus variáveis de infiltrado inflamatório (ALEKSUNES *et al.*, 2005; KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005). A predominância da necrose em região centrolobular justifica-se pela menor oxigenação dessa zona, e, principalmente, devido a maior presença de citocromo P450 nos hepatócitos centrolobulares (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005; BELARDINELLI, 2008; SANTOS, 2012). Em modelos murinos, a necrose provocada começa a ser observada em 3 horas, assumindo a característica de necrose centrolobular típica a partir de 6 horas da administração da superdosagem, e atingido o grau máximo em

24 horas (NEWSOME *et al.*, 2000; WILLIAMS *et al.*, 2014). Em lesões mais graves ou de maior duração, a necrose se estende por todas as zonas do parênquima hepático, com destruição maciça de hepatócitos e desorganização arquitetural (ALEKSUNES *et al.*, 2005).

Além das alterações histológicas, a dosagem elevada de paracetamol pode ocasionar alterações enzimáticas e metabólicas. As enzimas conhecidas como aminotransferases, como a aspartato aminotransferase – AST e a alanina aminotransferase – ALT, são proteínas séricas que se elevam em lesões hepatocelulares, não sendo, no entanto, marcadores específicos de dano hepático (MINCIS e MINCIS, 2006). Na injúria hepática provocada pelo paracetamol em modelos experimentais, as alterações de AST e ALT iniciam-se após 6 horas da injúria, com aumento progressivo até 24 horas após, e leve decréscimo posterior (ALEKSUNES *et al.*, 2005; SILVA, 2012; WILLIAMS *et al.*, 2014). Outras alterações sistêmicas, como anemia e metahemoglobinemia, podem ocorrer devido a superdosagem dessa droga, de forma independente da lesão hepática e causando danos sistêmicos importantes (NEWSOME *et al.*, 2000). Em modelos experimentais, essas complicações podem ser causa de óbito de animais, mais frequentemente após 24 horas da administração do medicamento (SANZ-GARCIA *et al.*, 2013).

O modelo de injúria hepática por paracetamol tem ainda algumas particularidades a serem consideradas. O nível de hidratação, o jejum e o estado nutricional dos animais podem influenciar os resultados (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005; BELARDINELLI, 2008). Diferenças no metabolismo hepático entre diferentes espécies podem dificultar a escolha da dose, por exemplo, visto que não existe uma padronização estabelecida (VIEIRA, 2014). Em camundongos, a administração de doses muito elevadas, acima de 1 g/kg, leva a morte dos animais por causas não hepáticas, incluindo metahemoglobinemia refratária, edema pulmonar, lesões miocárdicas e renais (NEWSOME *et al.*, 2000; KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005). Doses entre 300 a 400 mg/kg são capazes de produzir injúria moderada, caracterizada por alterações histológicas e metabólicas, sem efeitos extra-hepáticos significativos (ALEKSUNES *et al.*, 2005; IGARASHI *et al.*, 2014). Apesar das particularidades, considerando todas as alterações induzidas no fígado pela sobrecarga com paracetamol, esse modelo químico de injúria hepática parece adequado para estudar a morfofisiologia desse órgão e sua relação com a função do baço.

1.3 Justificativa

O baço é um órgão com diversas funções já estabelecidas, como a produção de imunoglobulinas, fagocitose de microrganismos, filtração do sangue com remoção de eritrócitos senescentes ou defeituosos, reciclagem do ferro, e participação no metabolismo lipídico (MARQUES e PETROIANU, 2003a; MEBIUS e KRAAL, 2005; PETROIANU *et al.*, 2006). Ainda assim, técnicas de conservação do órgão ainda são pouco difundidas, e a realização de esplenectomias totais ainda é frequente em determinadas situações clínicas (RESENDE, PETROIANU e JUNIOR, 2002).

A preservação do parênquima esplênico no tratamento de lesões traumáticas do órgão ou de patologias que cursam com esplenomegalia e hiperesplenismo deve ser sempre encorajada. Já foram descritos diferentes métodos conservadores, como suturas, próteses, agentes hemostáticos, ou mesmo a realização preferencial de esplenectomias parciais (RESENDE e PETROIANU, 2002; PETROIANU e PETROIANU, 2005; PAULO *et al.*, 2010). Mediante a impossibilidade de preservação do baço *in situ*, no entanto, o implante esplênico autógeno surge como a única alternativa para manutenção das funções do órgão (PETROIANU e PETROIANU, 2005). Vários trabalhos têm mostrado a recuperação morfofuncional dos implantes esplênicos e essa técnica vem sendo utilizada para avaliar as funções do baço em modelos experimentais (NUNES *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2010; PEROBELLI *et al.*, 2011).

Embora diversos estudos tenham demonstrado relações metabólicas e fagocitárias entre o baço e o fígado, ainda são incipientes pesquisas que avaliem a interação funcional entre os dois órgãos e o papel do baço frente às sobrecargas e lesões hepáticas (PETROIANU, 2003). Os modelos experimentais de injúria hepática são amplamente utilizados para a avaliação das funções do fígado, do processo de necrose e regeneração dos hepatócitos, e da microarquitetura do órgão (NEWSOME *et al.*, 2000). Entretanto, não existem estudos que correlacionem a função esplênica com a injúria hepática induzida experimentalmente.

Assim, o presente estudo visa avaliar a regeneração morfológica e a recuperação funcional do implante esplênico autógeno, e analisar a relação entre as funções esplênica e hepática em um modelo experimental murino de injúria hepática medicamentosa. Os resultados desse trabalho podem contribuir para a melhor compreensão da relação funcional entre o baço e o fígado, além de permitirem a

avaliação e padronização temporal da recuperação da morfologia e da função de filtração pelo implante esplênico autógeno.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a regeneração morfológica e a capacidade de filtração do implante esplênico autógeno em modelo experimental murino, e investigar se a presença de parênquima esplênico funcional altera a evolução de uma injúria hepática quimicamente induzida por superdosagem de paracetamol.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar a função de filtração do baço e do implante esplênico através de técnicas hematológicas (contagem de CHJ e EI), ponderando a sensibilidade e especificidade das mesmas;
- Avaliar histologicamente a regeneração esplênica após quatro semanas do implante autógeno de forma comparativa ao baço normal;
- Analisar o perfil enzimático hepático após uma injúria quimicamente induzida por superdosagem de paracetamol, através da dosagem de AST e ALT, de forma comparativa entre os grupos experimentais.
- Realizar avaliação histológica hepática após uma injúria quimicamente induzida por superdosagem de paracetamol, de forma comparativa entre os grupos experimentais.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados 52 camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas, a partir de quatro semanas de idade, provenientes do biotério externo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Os animais permaneceram no setor de experimentação do Laboratório de Imunologia e foram mantidos em estante ventilada e gaiolas padrão, forradas com maravalha, com quatro animais cada. A alimentação foi baseada em dieta composta por ração sólida padrão e água. Os animais permaneceram por quatro semanas em período de adaptação e observação no setor de experimentação antes do início do experimento. Os camundongos foram acompanhados, sendo os procedimentos e as intercorrências registrados.

O modelo experimental murino de esplenectomia e implante autógeno já havia sido padronizado e vem sendo utilizado com ótimos resultados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (NUNES *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2010; PEROBELLI *et al.*, 2011; REZENDE *et al.*, 2011). Além disso, estudos prévios mostraram que a toxicidade hepática pelo paracetamol em camundongos possui fisiopatologia e comportamento em relação a dose muito semelhante aos humanos, tornando esse modelo experimental um dos mais frequentemente usados e justificando a escolha da espécie (NEWSOME *et al.*, 2000).

Os animais foram divididos inicialmente em quatro grupos, representados na Tabela 1, foram assim distribuídos: Grupo 1: Operação Simulada (OS) – 16 camundongos submetidos a operação simulada; Grupo 2: Esplenectomia Total (ET) – 16 camundongos esplenectomizados; Grupo 3: Omento Maior (OM) – 16 camundongos esplenectomizados e submetidos ao transplante autógeno de baço em omento maior. Grupo 4: Animais Controle (AC) – quatro camundongos não submetidos a nenhuma intervenção cirúrgica ou medicamentosa.

Tabela 1: Grupos experimentais.

Sigla	Grupo	Número de animais	Procedimentos
OS	Operação Simulada	16	Exploração da cavidade
ET	Esplenectomia Total	16	Esplenectomia total
OM	Omento Maior	16	Esplenectomia total e implante esplênico autógeno
AC	Animais Controle	4	Observação

O grupo OS é importante para descartar a interferência do trauma anestésico-cirúrgico nos experimentos, sendo um grupo controle associado ao procedimento cirúrgico e, por conseguinte, ao modelo de implante esplênico autógeno. O grupo AC é o grupo controle da injúria hepática medicamentosa, necessário para a análise comparativa dos resultados. Posteriormente, cada um dos três primeiros grupos foi subdividido aleatoriamente em dois subgrupos de 8 camundongos cada, sendo: Subgrupo A: camundongos avaliados após 12 horas de injúria hepática medicamentosa; e Subgrupo B: camundongos avaliados após 24 horas de injúria hepática medicamentosa.

O projeto está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (Protocolo 019/2014).

3.2 Anestesia e Intervenção Cirúrgica

Após o período de adaptação, com oito semanas de idade, os animais foram submetidos à anestesia e intervenção cirúrgica. A anestesia foi realizada intraperitonealmente com solução composta por xilazina 100mg/kg e cetamina 100mg/kg.

A intervenção cirúrgica foi realizada na capela de fluxo laminar e utilizou material previamente esterilizado. Nos animais que passaram por operação simulada (grupo 1), foram realizados laparotomia mediana, inventário da cavidade abdominal, mobilização do baço e isolamento dos vasos esplênicos e laparorráfia. Nos grupos esplenectomizados (grupos 2 e 3) foram realizados laparotomia mediana,

esplenectomia total convencional, ligadura do pedículo vascular e dos vasos do ligamento esplenogástrico com categute simples no 5-0 em separado. No grupo do implante autógeno (grupo 3), 30% do parênquima esplênico ressecado foi individualizado e implantado em omento maior com fixação com categute simples 5-0. (Figura 2).

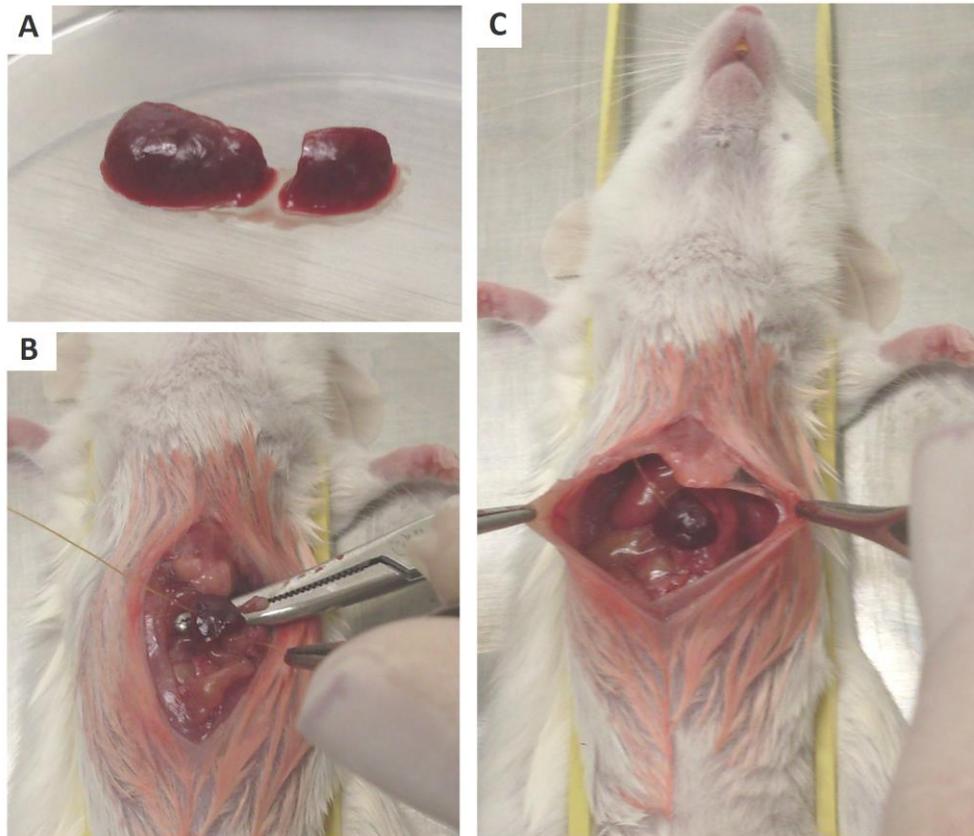


Figura 2: Imagens ilustrativas da técnica cirúrgica utilizada para o grupo submetido a esplenectomia e implante esplênico. Individualização de 30% do baço (A), para fixação em omento maior (B). Aspecto final antes do fechamento da cavidade (C).

3.3 Coleta de Sangue

Após o procedimento cirúrgico, foi realizada a coleta de sangue no 7º, 14º e 28º dia pós-operatório. Nessas coletas, foram obtidos cerca de 0,1ml de sangue através de punção do plexo caudal lateral sob imobilização manual. O volume retirado foi utilizado para a preparação de esfregaço em lâminas para análise de citologia hematológica. No 29º dia pós-operatório, 12 ou 24 horas após provocação de injúria hepática com paracetamol, também foi realizada coleta por exsanguinação por punção cardíaca sob anestesia, sendo obtidos aproximadamente 0,5 a 1 ml de sangue utilizado para obtenção de soro para dosagem de transaminases hepáticas.

A coleta de sangue realizada no grupo OS estabeleceu os valores esperados para camundongos com função esplênica íntegra. Já os exames laboratoriais e histológicos do grupo AC estabeleceram os valores esperados para camundongos com função hepática preservada.

3.4 Contagem de Corpúsculos de Howell-Jolly

Os esfregaços de sangue periférico de todos os animais, obtidos nos 7°, 14° e 28° dias pós-operatórios, foram corados pela técnica de Leishmann e analisados sob microscopia óptica para contagem dos corpúsculos de Howell-Jolly (CHJ), exemplificados na Figura 3A. A contagem foi realizada em 1000 hemácias por lâmina, e os resultados foram registrados de forma percentual. Valores superiores a 4% indicam função esplênica insuficiente (MARQUES *et al.*, 2014).

3.5 Contagem de Eritrócitos com Indentações (“Pitted Cells”)

Para realização da contagem dos eritrócitos com indentações (EI), exemplificados na figura 3B, uma gota de sangue de cada animal foi acrescida a 1ml de glutaraldeído a 2%, e armazenada em geladeira a 4-8°C até a análise. Para preparo das lâminas, uma gota do material foi colocada sobre a lâmina, coberta com uma lamínula e observada sem coloração à microscopia por contraste de fase. A contagem das indentações foi realizada em 1000 hemácias por lâmina, e os resultados foram registrados de forma percentual. Valores superiores a 4% indicam função esplênica insuficiente (ROGERS, SERJEANT e SERJEANT, 1982; ZOLI *et al.*, 1998).

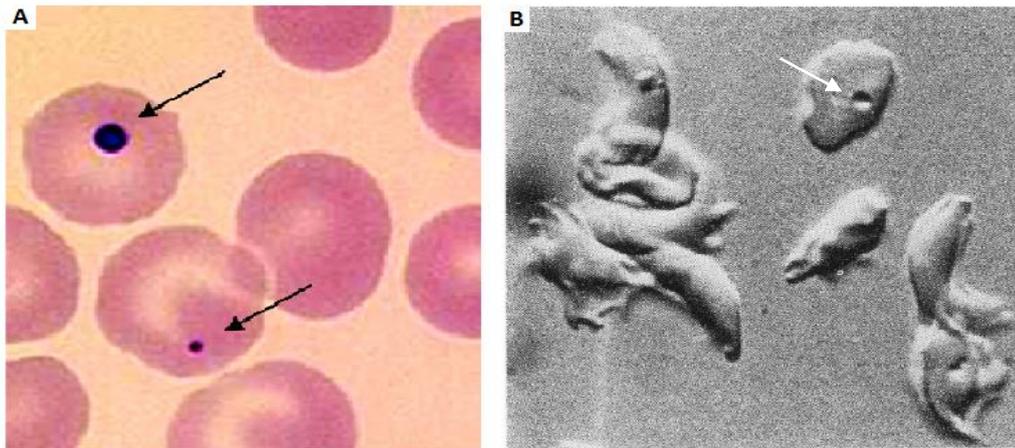


Figura 3: Técnicas hematológicas utilizadas para avaliação da função de filtração do baço. Corpúsculos de Howell-Jolly (seta) em esfregaço de sangue periférico corado pela técnica de May-Grunwald-Giemsa, visualizados sob microscopia óptica (A). Eritrócitos com indetações (“pitted red blood cells” – seta), aqui exemplificados em um paciente com anemia falciforme, visualizados sob microscopia de interferência (B). Fonte: ROGERS, SERJEANT e SERJEANT, 1982; BROUSSE, BUFFET e REES, 2014.

3.6 Injúria Hepática Medicamentosa

No 28º dia após a intervenção cirúrgica, os animais dos grupos experimentais OS, ET e OM receberam uma dose única de paracetamol (400mg/kg) por gavagem, permanecendo em observação pelas horas seguintes. Esses grupos experimentais foram então aleatoriamente divididos em dois subgrupos com oito animais cada, sendo o primeiro subgrupo A eutanasiado após 12 horas da injúria medicamentosa, e o segundo subgrupo B eutanasiado após 24 horas da injúria medicamentosa. O grupo AC não recebeu paracetamol, sendo observado e analisado conjuntamente com o subgrupo B.

A escolha da dose e do tempo de eutanásia utilizados foi baseada em estudos prévios, que mostraram que doses de paracetamol entre 300 e 400mg/kg são suficientes para provocar uma lesão significativa dentro das primeiras 24 horas no modelo experimental utilizado, com minimização do risco de falência de múltiplos órgãos e sistemas e de óbito por causas extra-hepáticas (ALEKSUNES *et al.*, 2005; IGARASHI *et al.*, 2014).

3.7 Avaliação dos Níveis Séricos de Transaminases

Após um período de 12 ou 24 horas de observação após a injúria hepática medicamentosa, os camundongos dos grupos OS, ET e OM foram eutanasiados por exsanguinação sob anestesia. Os animais do grupo AC foram também eutanasiados

para os mesmos procedimentos. Obteve-se de 0,5 a 1ml de sangue de cada camundongo para análise das transaminases séricas. Foram dosadas a alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). As amostras foram centrifugadas a 2600rpm para obtenção do soro. Devido ao baixo volume das amostras e a técnica de coleta, a ocorrência de hemólise, que poderia afetar as dosagens que seriam realizadas, foi avaliada a partir de um método visual (Figura 4), sendo descartadas as amostras com hemólise superior a 200mg/dl. As amostras selecionadas foram então analisadas de forma automatizada através do método cinético UV otimizado, em um laboratório externo devidamente certificado (Lemos Diagnósticos – Laboratório e Imagem, Juiz de Fora-MG).

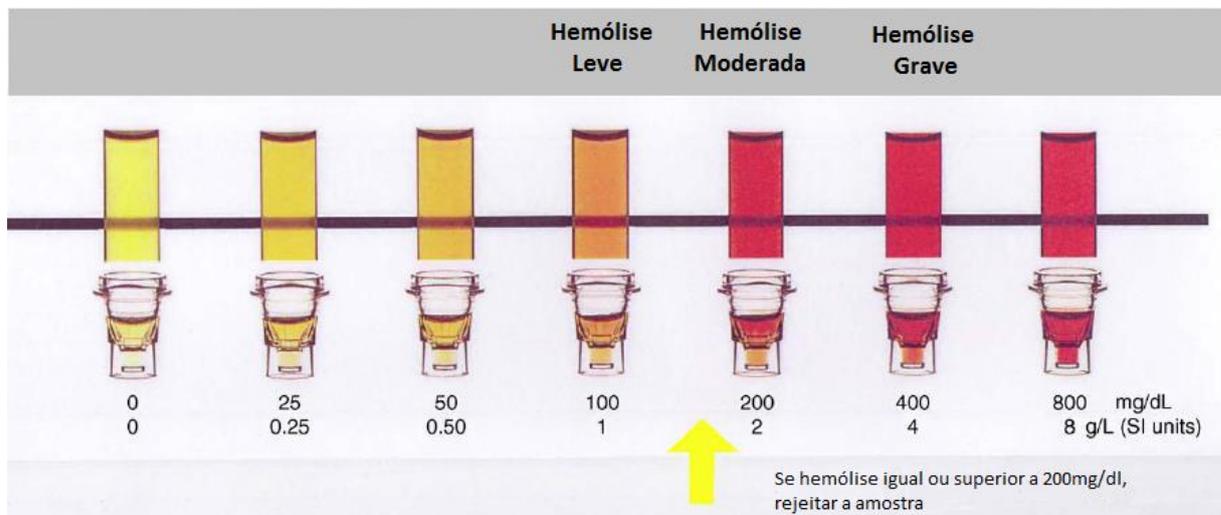


Figura 4: Escala visual para avaliação de hemólise e integridade da amostra. Adaptado de: Dugan *et al.*, 2005.

Os resultados obtidos com essa análise, que serão apresentados no item 4.4, foram inicialmente inconsistentes. Foi então questionado se os valores obtidos ocorreram em decorrência de erros secundários a condições técnicas experimentais ou se eram realmente inerentes aos grupos. Assim, a dosagem de transaminases foi repetida em dois experimentos piloto com adaptações técnicas:

- Piloto 1: Foram utilizados seis animais, com aprimoramento da técnica de coleta e envio das amostras para o mesmo laboratório. Esses animais não foram submetidos a nenhum procedimento cirúrgico, nem a injúria medicamentosa por paracetamol. O objetivo era principalmente aperfeiçoar a

técnica de coleta minimizando a hemólise. Esse procedimento resultou em uma hemólise menos significativa de acordo com a escala visual, porém os resultados continuaram incongruentes.

- Piloto 2: Foram utilizados oito animais, com manutenção da técnica de coleta do Piloto 1 e envio das amostras para um laboratório diferente, porém igualmente qualificado (R.G. Saggiaro – Análises Clínicas, Juiz de Fora-MG). Nessa repetição, os camundongos foram divididos em dois grupos, sendo que um deles recebeu paracetamol 400mg/kg por gavagem 24 horas antes da coleta e o outro não sofreu intervenção (controle). O objetivo era descartar um problema inerente ao laboratório previamente utilizado. A injúria hepática foi induzida em um dos grupos, para que os resultados obtidos pudessem ser comparados de maneira mais adequada aos valores do experimento original. Entretanto, os resultados foram, mais uma vez, inconsistentes.

3.8 Estudo Histopatológico

Após a exsanguinação sob anestesia, seguida de ruptura do diafragma, os animais foram submetidos a um inventário da cavidade abdominal. Os baços do grupo OS e os implantes do grupo OM foram removidos e fixados em sua totalidade. A retirada do fígado foi realizada em todos os animais do experimento, sendo o lobo esquerdo e o maior segmento do lobo direito de cada animal selecionados para avaliação histológica.

O material obtido foi fixado em solução de formol tamponado a 10% e submetido à técnica histológica de rotina. Cortes histológicos com 3 µm de espessura foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e as análises morfológicas, bem como a captura das imagens foram realizadas utilizando um microscópio Olympus (BX53F) equipado com objetivas U-PlanFI 10/0.30, 20/0.50 e 40/0.75. As imagens foram capturadas por uma câmera Olympus DP73 e software CellSensImaging (versão 5.1, Olympus, EUA).

Foram analisadas e consideradas para esse estudo as seguintes características na histologia esplênica:

- estrutura geral do órgão;
- padrão morfológico da polpa branca, existência de folículos primários e secundários e bainha periarteriolar;
- padrão morfológico da polpa vermelha.

A avaliação da histologia esplênica foi realizada de forma comparativa entre os grupos operação simulada OS (baço íntegro) e o grupo OM, em busca da identificação de características estruturais nos implantes esplênicos que preservassem a morfologia do baço intacto.

Com relação à histologia hepática, as seguintes características foram avaliadas:

- organização estrutural padrão, com hepatócitos distribuídos ao redor da veia centrolobular em agrupamentos hexagonais, e com o espaço porta contendo um ramo da veia porta, um ramo da artéria hepática e um ducto biliar, em suas interseções (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005).
- presença de edema, degeneração hidrópica e balonização de hepatócitos, decorrentes do acúmulo de líquido intracelular por desequilíbrio osmótico da membrana celular (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005);
- presença de necrose, especialmente na região centrolobular, por ser a mais característica da injúria medicamentosa por paracetamol (ALEKSUNES *et al.*, 2005; BELARDINELLI, 2008);
- presença de infiltrado inflamatório, que pode ser observado devido ao recrutamento celular pelo processo inflamatório estéril induzido pelo modelo (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005).

O avaliador das lâminas foi mantido cego quanto ao grupo experimental de cada amostra. Para melhor comparação entre os grupos experimentais, foi utilizado um escore de pontuação adaptado de Aleksunes e colaboradores (2005) (Tabela 2).

Tabela 2: Escore de pontuação da injúria hepática histológica. Adaptado de: Aleksunes *et al.*, 2005.

Pontuação	Características Histológicas
Grau de necrose	
0	Ausente – ausência de necrose
1	Leve – presença de necrose discreta em hepatócitos isolados ou em pequenos grupos
2	Moderada – necrose moderada em grupos de hepatócitos na região centrolobular
3	Grave – necrose grave na região centrolobular
4	Muito grave – necrose grave e ampla, estendendo-se além da região centrolobular (afetando mais de 50% dos hepatócitos)
Degeneração hidrópica (balonização)	
0	Ausente
1	Presente
Infiltrado Inflamatório	
0	Ausente
1	Discreto e/ou localizado
2	Evidente e/ou difuso

Adaptado de: Aleksunes *et al.*, 2005.

3.9 Análise Estatística

Os dados coletados foram analisados com o auxílio dos programas Microsoft Excell 2013, Assistat 7.7 e Medcalc 15.2.2. A normalidade dos dados foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk.

Os dados foram submetidos a análise de variância seguida do pós-teste de Tukey. Para todas as análises, um valor de P menor 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Para a cálculo da sensibilidade e especificidade das técnicas hematológicas utilizadas para avaliação da função de filtração do baço, os resultados obtidos com as contagens foram analisados em comparação ao padrão ouro de informação disponível sobre a função esplênica, ou seja, a informação cirúrgica da presença ou ausência do baço.

3.10 Delineamento experimental

O delineamento experimental do estudo pode ser observado na Figura 5.

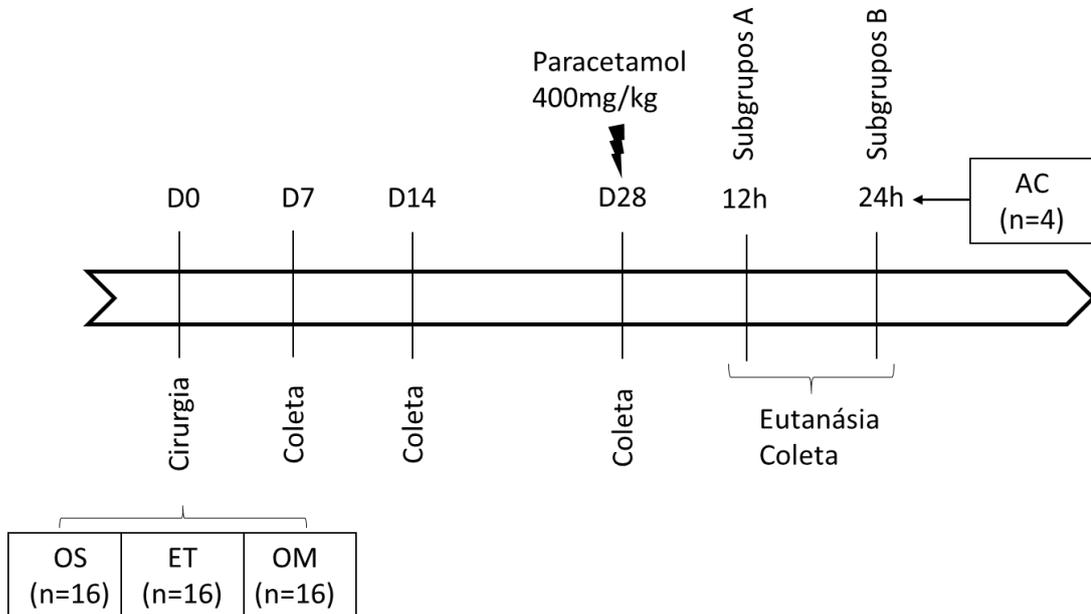


Figura 5: Delineamento experimental. Os animais do grupo OS, ET e OM foram submetidos ao delineamento completo. Os animais do grupo AC foram acompanhados sem intervenções durante todo o experimento, sendo submetidos apenas à coleta final. *Coletas de sangue para técnicas hematológicas. †Coleta de sangue para dosagem de transaminases hepáticas e de parênquima hepático e esplênico para avaliação histológica. OS = operação simulada; ET = esplenectomia total; OM = omento maior; AC = animais controle.

4 RESULTADOS

4.1 Características dos grupos experimentais

Os animais utilizados nos experimentos foram aleatoriamente randomizados entre os grupos experimentais. A Tabela 3 mostra as médias e variações de peso ao início e final do experimento para cada grupo, e a duração média das cirurgias realizadas.

Tabela 3: Dados de peso e tempo de cirurgia médios nos grupos experimentais. ^aOS = operação simulada; ET = esplenectomia total; OM = omento maior; AC = animais controle.

Grupos^a	Peso D0 (g)	Tempo Operatório (m:s)	Peso D28 (g)
OS	19,57	3:09	21,79
ET	19,71	4:33	21,94
OM	19,59	6:16	21,00
AC	19,62	-	21,35

Cinco óbitos foram registrados durante o experimento, sendo que quatro deles ocorreram nos dias subsequentes a abordagem cirúrgica, sugerindo complicações inerentes ao procedimento. Um último óbito ocorreu entre 12 e 24 horas após a administração do paracetamol, sugerindo complicações relacionadas à toxicidade do medicamento. Esses animais foram excluídos do experimento.

4.2 Avaliação da função de filtração do baço

A função de filtração esplênica foi avaliada por duas técnicas hematológicas, a contagem de corpúsculos de Howell-Jolly (CHJ) e a contagem de eritrócitos com indentações (EI). Para ambas, valores acima de 4% indicam uma função esplênica inadequada.

Os animais do grupo OS apresentaram valores inferiores a 4% em todos os tempos de observação, demonstrando a manutenção da função esplênica e descartando a interferência do trauma anestésico-cirúrgico nos experimentos.

Os animais do grupo ET mostraram uma função de filtração inadequada já a partir do 7^o dia pós-operatório em ambas as técnicas utilizadas, resultado que se manteve nas demais coletas (Figura 6). O grupo OM se comportou de forma

semelhante ao grupo ET após 7 dias da cirurgia, mas evoluiu com progressiva queda das contagens até se tornar semelhante ao grupo OS no 28º dia após a cirurgia.

Os valores elevados no grupo OM no 7º dia podem estar associados a regeneração em curso. A queda desses valores, demonstrando uma função de filtração semelhante à do grupo controle no 28º dia, comprova a viabilidade da técnica e a recuperação morfofuncional dos implantes. Esses dados mostram que os implantes se tornaram funcionalmente semelhantes a um baço normal do ponto de vista da filtração de eritrócitos, apresentando contagens de CHJ e EI abaixo de 4% a partir de 14 dias do procedimento cirúrgico.

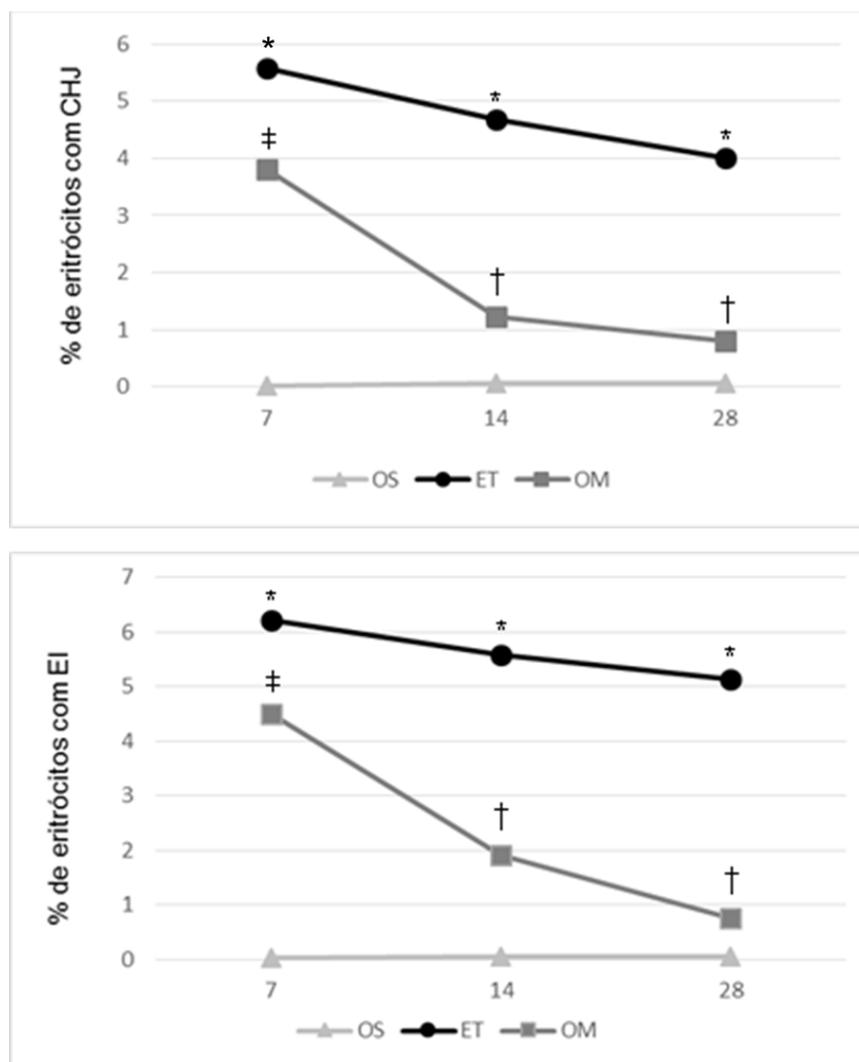


Figura 6: Contagens de corpúsculos de Howell-Jolly (CHJ) e eritrócitos com indentações (EI) para os três grupos experimentais, com 7, 14 e 28 dias da intervenção cirúrgica. *P < 0,01 ET *versus* OS; †P < 0,01 OM *versus* ET; ‡ P < 0,01 OM *versus* OS (teste de Tukey). OS = operação simulada; ET = esplenectomia total; OM = omento maior.

Na avaliação de sensibilidade e especificidade das técnicas hematológicas utilizadas (Figura 7), os resultados obtidos com as contagens foram comparados com a informação cirúrgica como padrão ouro. Ambas as técnicas apresentaram valores elevados de sensibilidade e especificidade, com melhores resultados para a contagem de eritrócitos com indentações.

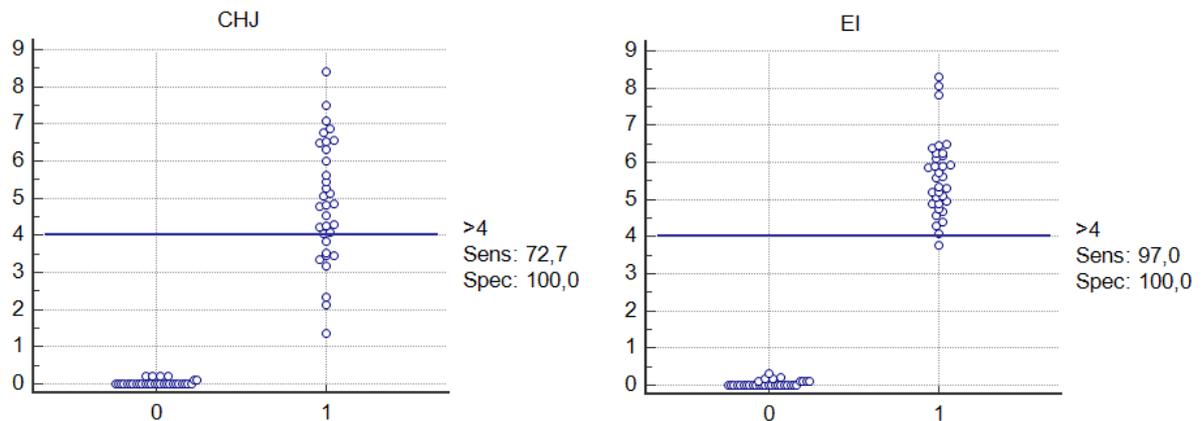


Figura 7: Gráficos de dispersão de pontos para avaliação de sensibilidade e especificidades técnicas hematológicas utilizadas. As amostras agrupadas sobre o número 0 são de animais com baço preservado, e aquelas sobre o número 1 pertencem a animais esplenectomizados. CHJ = corpúsculos de Howell-Jolly; EI = eritrócitos com indentações; Sens = sensibilidade; Spec = especificidade.

4.3 Avaliação da histologia dos implantes esplênicos

A avaliação histológica dos baços do grupo OS após 28 dias do procedimento cirúrgico apresentou uma arquitetura padrão do parênquima esplênico compatível com o descrito na literatura para a espécie, descartando a interferência do trauma anestésico-cirúrgico nos experimentos.

A avaliação histológica dos implantes esplênicos no grupo OM revelou uma organização estrutural semelhante à dos baços pertencentes a animais do grupo OS (Figura 8). É possível identificar a formação da polpa branca e da polpa vermelha, com a presença de agrupamentos linfocitários semelhantes a folículos linfoides.

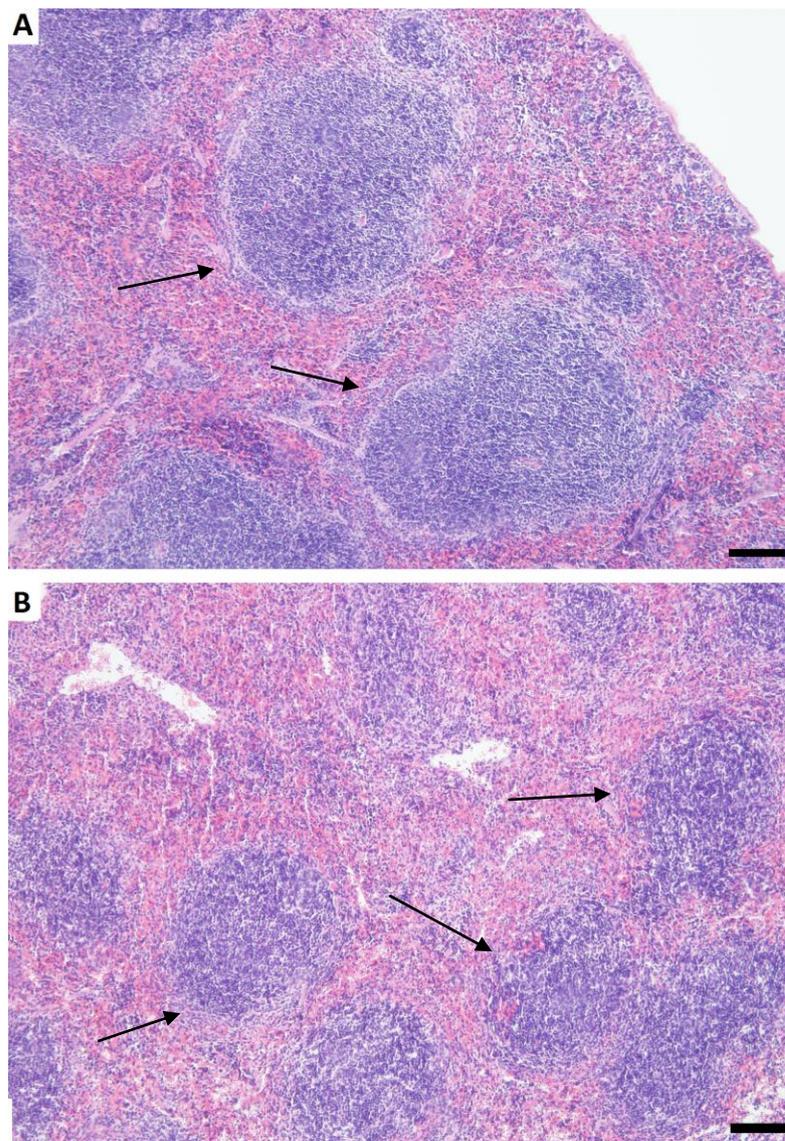


Figura 8: Imagem ilustrativa da histologia esplênica 28 dias após a intervenção cirúrgica. Histologia do baço de camundongos do grupo OS (A), e de implantes esplênicos de animais do grupo OM (B). Os folículos linfóides são indicados pelas setas. A barra representa 100 µm. OS = operação simulada; OM = omento maior.

O aspecto morfológico dos implantes, tomado em conjunto com os resultados da restauração da filtração eritrocitária, mostra que 28 dias após o procedimento cirúrgico é tempo suficiente para que os elementos principais da regeneração sejam estabelecidos.

4.4 Avaliação das transaminases hepáticas após injúria por paracetamol

O soro dos animais obtido 12 ou 24 horas após a indução de injúria hepática por paracetamol foi analisado quanto a dosagem das enzimas hepáticas AST e ALT, marcadores de lesão hepatocelular. Esses resultados são exibidos na Figura 9. Os

valores de referência para o método utilizado são: ALT – 5 a 38 U/L; AST – 10 a 37 U/L.

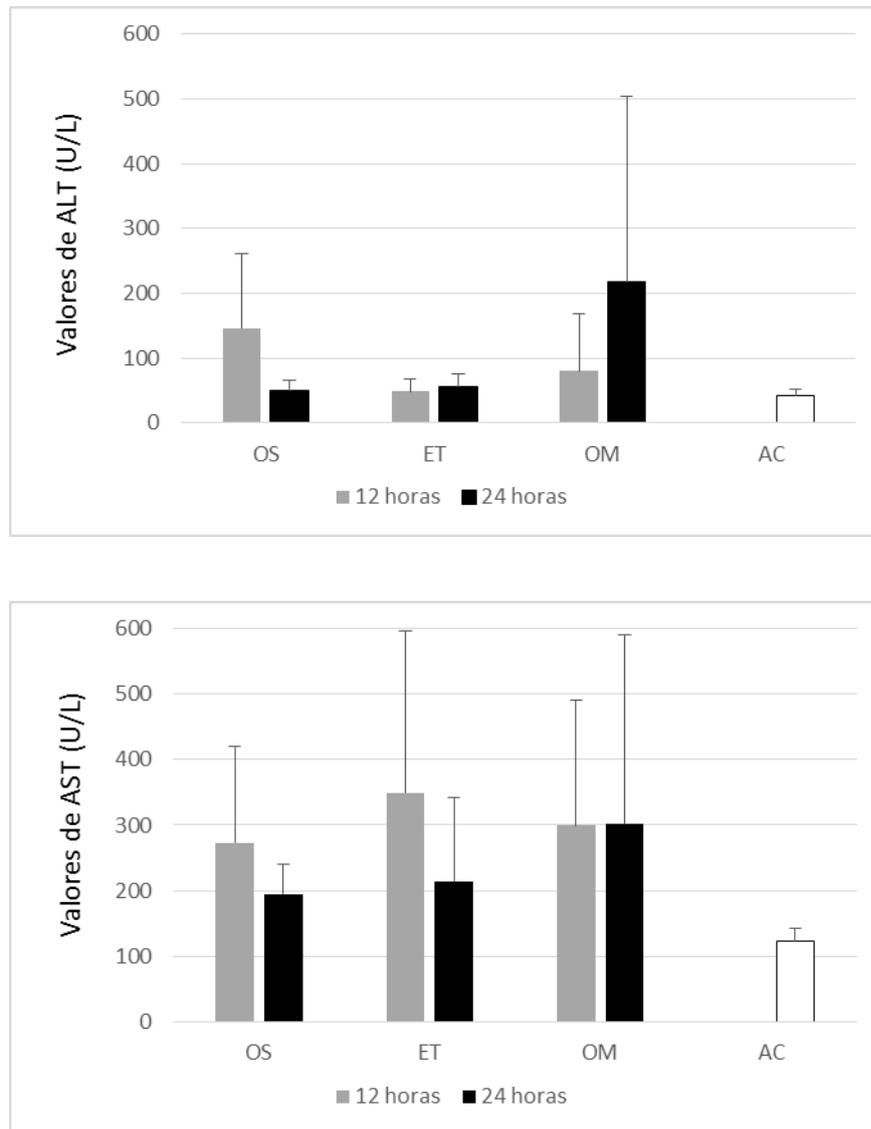


Figura 9: Avaliação das transaminases hepáticas após a injúria hepática medicamentosa. Gráficos representativos dos valores de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), em 12 e 24 horas após a indução de lesão hepática, para os diferentes grupos de tratamento. As dosagens para o grupo AC, que não recebeu nenhum tratamento, são mostradas a título de comparação. OS = operação simulada; ET = esplenectomia total; OM = omento maior; AC = animais controle.

A dosagem de AST, assim como a de ALT, pode ser alterada pela hemólise das amostras, embora a AST seja mais afetada por estar presente em grande quantidade no interior de eritrócitos (BASTOS, BERNER e RAMOS, 2010). Em adição, a exclusão das amostras com hemólise moderada ou extensa pelo método

da escala analógica pode não garantir resultados fidedignos (DUGAN *et al.*, 2005). A observação de valores bastante elevados de AST mesmo no grupo controle AC sugere a inadequabilidade dessa dosagem para a avaliação de lesão hepatocelular no modelo experimental utilizado. Assim, os valores de ALT, ainda que também possam ser afetados pela estratégia de coleta, seriam mais representativos da lesão hepática que se deseja analisar.

Para a ALT, as dosagens das amostras do grupo AC permaneceram dentro dos valores de referência. Apesar de o gráfico mostrar uma tendência para valores maiores de ALT no grupo OM, especialmente com 24 horas da injúria hepática, a análise de variância não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados, em nenhum dos intervalos de tempo avaliados. O desvio padrão elevado mostra a heterogeneidade das amostras, o que provavelmente dificultou o estabelecimento de significância estatística.

A inconsistência desses resultados motivou a realização de dois experimentos pilotos com menor número de animais e modificações técnicas, cujas condições já foram descritas.

No primeiro piloto realizado, foi possível verificar a confiabilidade do método de dosagem realizado pelo laboratório Lemos Diagnósticos, o que confere uma maior credibilidade aos valores obtidos no experimento original. No entanto, houve uma grande variabilidade no resultado de AST e ALT, o que se repetiu no segundo estudo piloto realizado. Diante da manutenção de valores incongruentes nos dois pilotos, o grupo de pesquisa optou por não utilizar os resultados das transaminases para obter conclusões em relação aos objetivos do trabalho.

4.5 Avaliação da histologia hepática após injúria por paracetamol

A avaliação da histologia hepática foi realizada 12 e 24 horas após a indução da injúria medicamentosa. Todas as alterações previstas no escore adaptado de Aleksunes e colaboradores (2005) foram observadas nas amostras estudadas. A Figura 10A demonstra a arquitetura hepática normal, conforme previamente descrito, com destaque para o espaço porta e a veia centrolobular. As demais imagens da Figura 10 ilustram as alterações encontradas no parênquima hepático após a injúria provocada por paracetamol. Na Figura 10B, podemos observar um infiltrado inflamatório focal próximo à região centrolobular, com predomínio de linfócitos e neutrófilos. A Figura 10C evidencia o edema e vacuolização do citoplasma dos

hepatócitos predominantemente ao redor da veia centrolobular, além da presença de hemorragia difusa, caracterizando um processo necrótico. Essas alterações foram mais pronunciadas em algumas amostras, por vezes estendendo-se além da região centrolobular, conforme exemplificado na Figura 10D, na qual também se destaca uma área de ampla hemorragia.

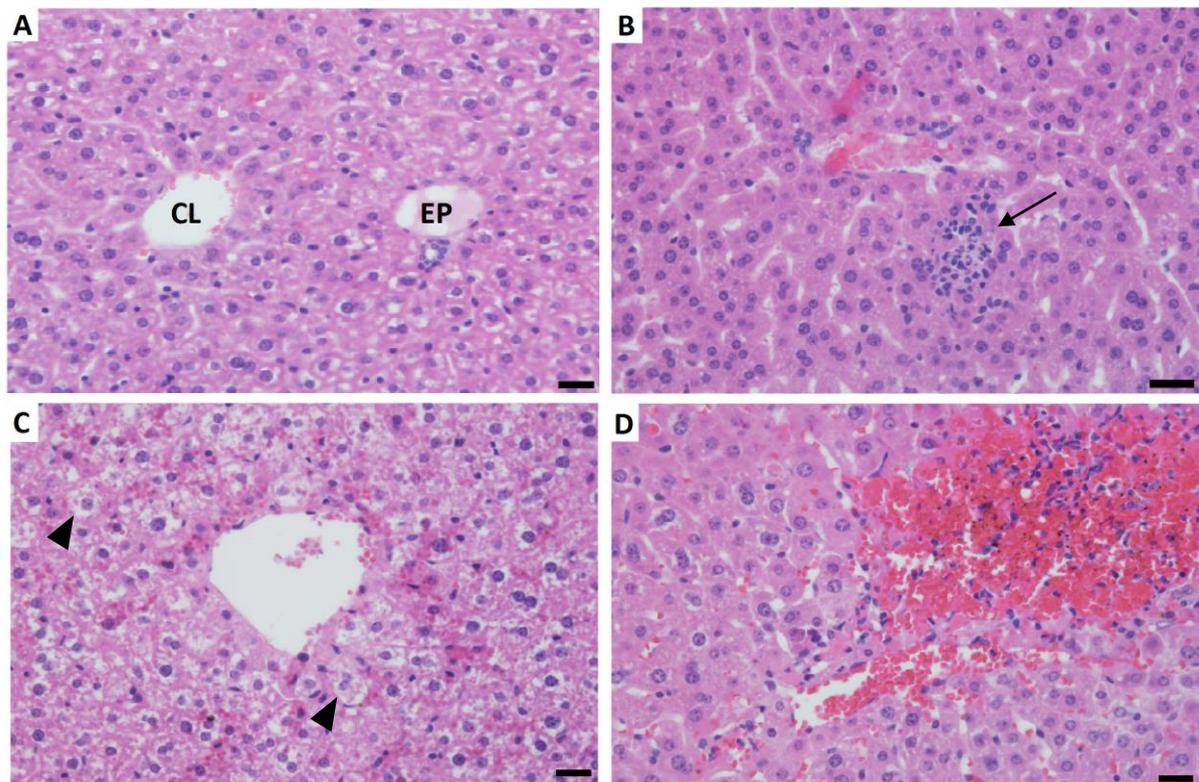


Figura 10: Imagem representativa das anormalidades do parênquima hepático frente a injúria por paracetamol. A. Exemplo de arquitetura hepática normal, com destaque para veia centrolobular (CL) e espaço portal (EP). B. Infiltrado inflamatório focal (seta) próximo a região centrolobular. B. Vacuolização e edema do citoplasma dos hepatócitos (cabeça da seta) em região centrolobular, além de focos de hemorragia. D. Intensa hemorragia estendendo-se além da região centrolobular, acompanhada de infiltrado inflamatório. As barras representam 20 μ m.

A Figura 11 mostra as lesões histológicas identificadas em cada grupo experimental, com 12 e 24 horas da injúria por paracetamol. Como a análise das alterações foi realizada após observação cuidadosa de todas as lâminas de cada grupo, e com rastreamento de cada lâmina por completo, imagens de um único campo são apenas ilustrativas.

De uma forma geral, foi possível observar um agravamento das lesões com o maior tempo de exposição à droga, em todos os grupos experimentais. Após 12 horas da injúria por paracetamol, hepatócitos da região centrolobular já apresentavam vacuolização e presença de infiltrados inflamatórios focais. Com 24

horas, os vacúolos se tornam maiores e se acumulam em um maior número de células, por vezes até em regiões próximas a tríade portal, e os hepatócitos assumem aspecto de maior degeneração. Regiões hemorrágicas também podem ser observadas, especialmente no grupo de animais esplenectomizados.

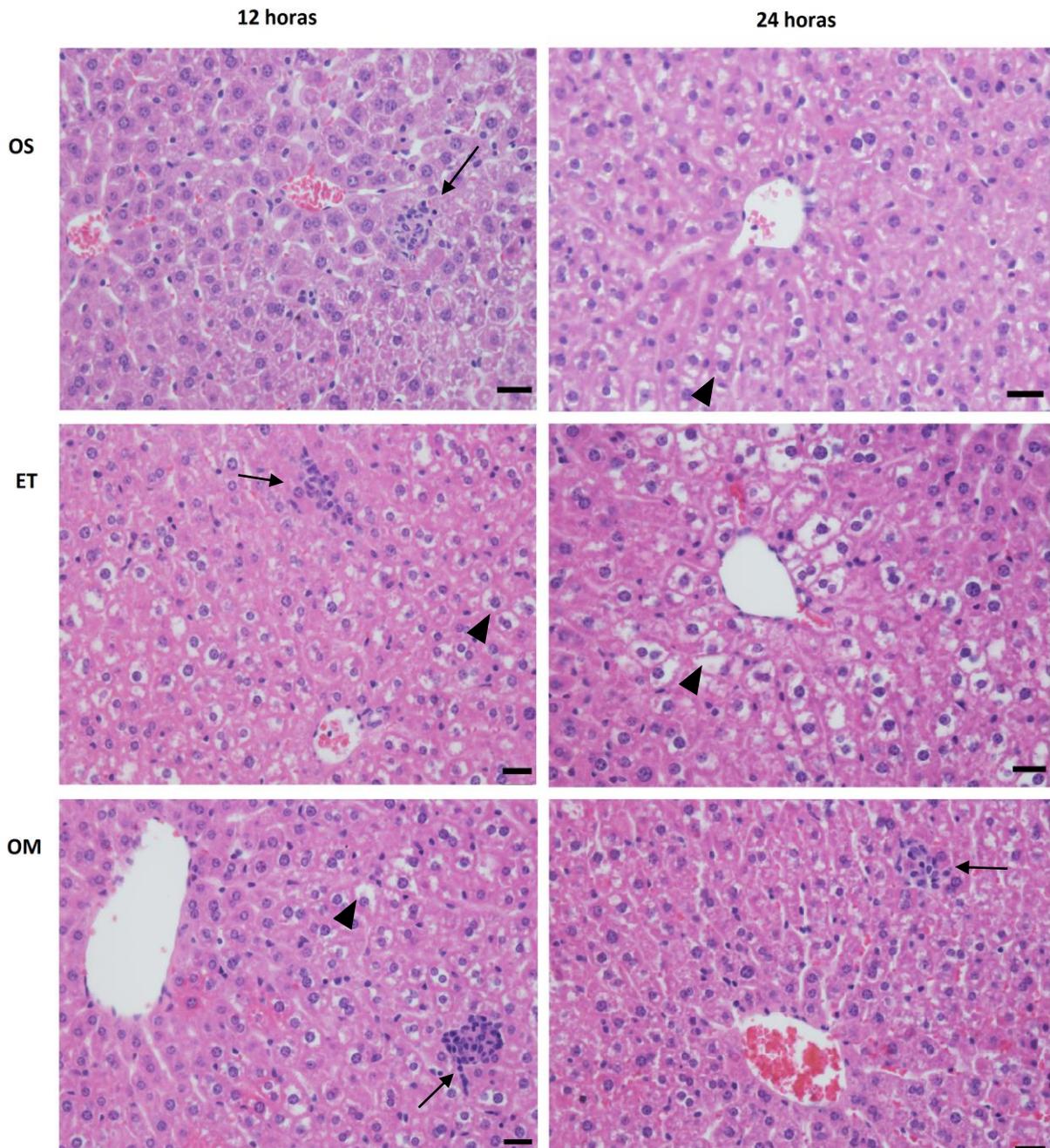


Figura 11: Imagem representativa das alterações na histopatologia hepática nos grupos experimentais, após 12 e 24 horas da injúria induzida por paracetamol, com destaque para as regiões centrolobulares. As setas apontam os infiltrados inflamatórios focais. As cabeças de seta exemplificam hepatócitos com edema e degeneração do citoplasma. As barras representam 20 μ m. OS = operação simulada; ET = esplenectomia total; OM = omento maior.

Além disso, com 24 horas da administração do paracetamol, algumas amostras se destacaram por apresentarem áreas extensas com aspecto entumecido, congesto e hemorrágico, com citoplasma mais eosinofílico, por vezes resultando em desorganização na arquitetura, que dificultava a identificação de espaços porta e veias centrolobulares. Essas alterações estão exemplificadas na Figura 12, e foram mais frequentemente encontradas em animais do grupo ET.

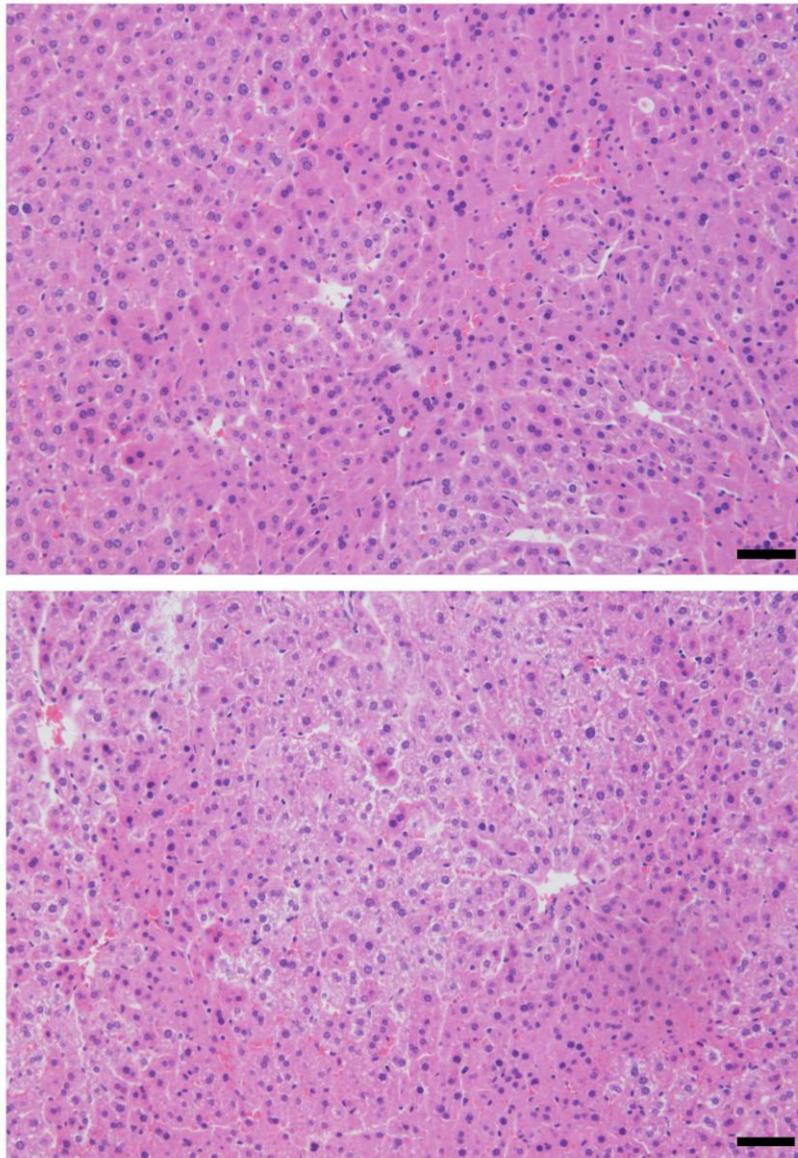


Figura 12: Imagem representativa de alterações adicionais observadas no grupo esplenectomia total com 24 horas da injúria provocada por paracetamol. Áreas mais eosinofílicas, hemorrágicas e com prejuízo da arquitetura normal podem ser observadas. As barras representam 50 μm .

A avaliação da histologia hepática foi também realizada considerando um escore de pontuação, adaptado de Aleksunes e colaboradores (2005), que avalia e

quantifica as anormalidades que podem estar presentes na injúria hepática induzida por paracetamol, como o infiltrado inflamatório, a degeneração hidrópica com balonização, e a necrose da região centrolobular, sendo esta última a alteração mais característica desse modelo. A Figura 13 mostra os resultados nos diferentes grupos experimentais, sendo que cada ponto representa o valor atribuído a um animal, e as barras representam as médias de pontuação de cada grupo. Os valores do grupo AC são apresentados a título de comparação.

Após 12 horas da injúria medicamentosa observa-se uma tendência a pontuações mais elevadas no grupo ET, embora não exista diferença estatística entre os grupos experimentais ($P > 0,05$).

Com 24 horas da injúria, os valores dos animais esplenectomizados divergiram dos demais de forma estatisticamente significativa ($P < 0,05$), sugerindo que a ausência da função esplênica pode favorecer a injúria hepática induzida por paracetamol. Adicionalmente, os animais do grupo OM apresentaram valores semelhantes ao grupo OS, indicando que os implantes esplênicos autógenos podem evitar um maior agravamento da injúria hepática nesse modelo experimental, de forma semelhante ao baço íntegro.

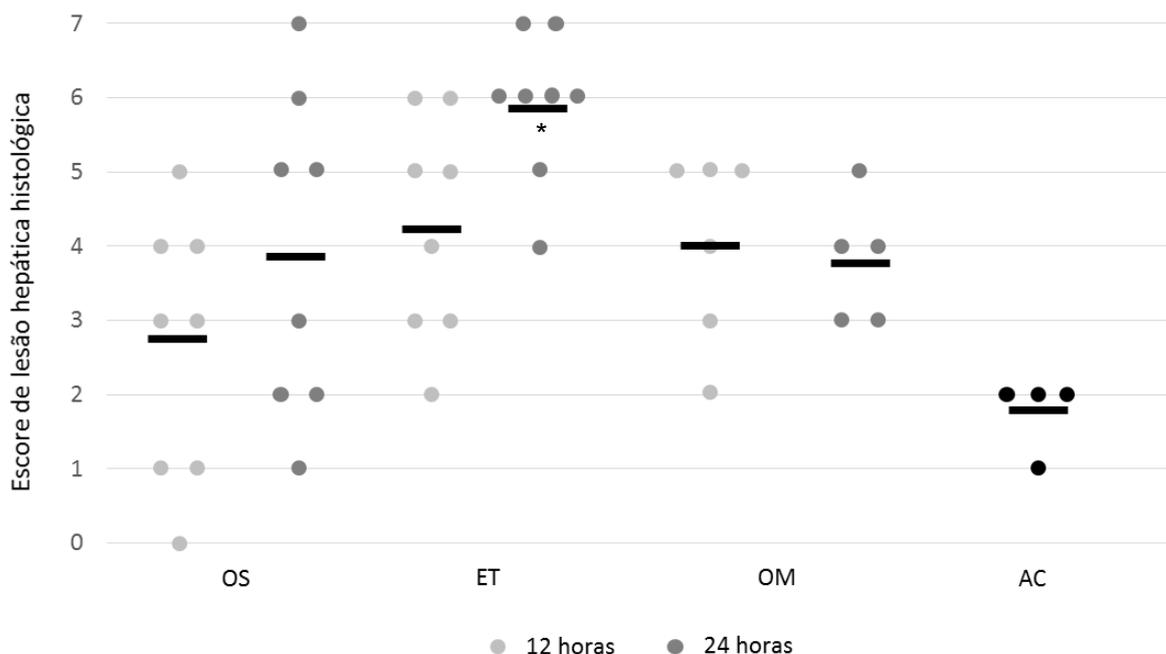


Figura 13: Pontuação no escore de avaliação das alterações histológicas hepáticas, para cada grupo experimental e nos diferentes tempos de análise. Os pontos representam o valor atribuído a cada animal, e as barras representam as médias de pontuação de cada grupo. Apenas os valores do grupo ET, com 24 horas da injúria, divergiram dos demais de forma estatisticamente significativa ($*P < 0,05$). OS = operação simulada; ET = esplenectomia total; OM = omento maior; AC = animais controle.

5 DISCUSSÃO

Por muitos anos acreditou-se que o baço era um órgão sem função definida, e que, por conseguinte, sua remoção não traria consequências ao organismo (WILKINS, 2002). Entretanto, atualmente, o papel do baço é bem conhecido, e diversas funções foram enumeradas. Do ponto de vista hematológico, destaca-se a remoção de eritrócitos senescentes ou defeituosos, com reciclagem do ferro, além da retirada de circulação de partículas coloidais e materiais estranhos ao organismo (SCHNITZER *et al.*, 1972; MEBIUS e KRAAL, 2005). Assim, pacientes com asplenia apresentam, por exemplo, maior viscosidade sanguínea, deformabilidade eritrocitária alterada, maior risco de trombose e maior gravidade em infecções por parasitas intra-eritrocitários (MIKO *et al.*, 2001; MIKO *et al.*, 2003; LAMMERS *et al.*, 2012). Há também evidências de que o baço tem influência no metabolismo lipídico, na obesidade e no processo de aterosclerose (REZENDE *et al.*, 2011; TARANTINO, SCALERA e FINELLI, 2013). Pacientes esplenectomizados apresentam hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e maior risco de cardiopatia isquêmica, enquanto pacientes com hiperesplenismo secundário a doenças hematológicas evoluem com redução do colesterol (PETROIANU *et al.*, 2006; ALBERTI *et al.*, 2012; TARANTINO, SCALERA e FINELLI, 2013).

Já do ponto de vista imunológico, o baço é um importante órgão linfoide, produtor de imunoglobulinas e responsável pela opsonização e fagocitose de microrganismos encapsulados (MARQUES e PETROIANU, 2003b; MIKO *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2010). Portanto, pacientes esplenectomizados possuem um maior risco de complicações infecciosas, sepse e óbito. A constatação do aumento da morbidade e mortalidade em doentes asplênicos reforça as indicações de que tratamentos conservadores devam ser preconizados nas afecções desse órgão (PAULO *et al.*, 2010). Nesse sentido, o implante esplênico autógeno surge como uma alternativa viável para situações em que a preservação do parênquima esplênico *in situ*, ainda que parcialmente, não seja possível. Diversos estudos demonstraram a recuperação da função imunológica e de filtração através dessa técnica, comprovando, especialmente, um menor risco de sepse se comparado a pacientes esplenectomizados (MARQUES e PETROIANU, 2003b).

O uso de um modelo murino de implante esplênico autógeno que compara

animais controle, esplenectomizados e autotransplantados tem se mostrado adequado para avaliar as diversas funções do baço e a recuperação das mesmas pelos implantes (NUNES *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2010; PEROBELLI *et al.*, 2011; REZENDE *et al.*, 2011). No presente estudo, esse modelo foi utilizado para avaliar a função de filtração do baço, através de técnicas hematológicas que demonstram a capacidade desse órgão de remover hemácias senescentes ou defeituosas (contagem de corpúsculos de Howell-Jolly e de eritrócitos com indentações). Os animais que receberam os implantes apresentaram uma capacidade de filtração superior ao grupo esplenectomizado, em ambas as técnicas, já a partir do 14^o dia da intervenção cirúrgica, e a partir do 28^o dia já demonstravam um funcionamento semelhante ao grupo controle. Esses resultados estão de acordo com estudos de Souza (2011) e Marques e colaboradores (2014), que demonstraram uma filtração esplênica semelhante nesse período de tempo através da contagem de corpúsculos de Howell-Jolly (CHJ), em modelos experimentais similares.

As contagens de corpúsculos de Howell-Jolly e de eritrócitos com indentações tiveram resultados semelhantes e ambas as técnicas mostraram sensibilidade e especificidade adequadas para a avaliação da função de filtração esplênica no modelo experimental utilizado. Outros estudos mostraram resultados semelhantes ao compararem as duas técnicas em pacientes com hipoesplenismo (CASPER *et al.*, 1976; CORAZZA *et al.*, 1990). Em adição, no estudo de Lammers e colaboradores (2012), os dois métodos (CHJ e EI) apresentaram boa correlação com a avaliação da função do baço obtida por meio de cintilografia. Esses resultados sugerem que as técnicas hematológicas utilizadas são bons marcadores da função esplênica, podendo ser úteis para a triagem de pacientes com risco de hipoesplenismo.

A avaliação da histologia esplênica mostrou que os implantes, após quatro semanas da intervenção cirúrgica, apresentavam arquitetura semelhante à do baço normal, com aglomerados celulares característicos do folículo linfóide primário, e uma organização similar às polpas branca e vermelha. Esse resultado está de acordo com os descritos em outros trabalhos experimentais, que mostraram uma organização arquitetural semelhante do implante, após cerca de quatro semanas da esplenectomia e realização do implante (TORRES *et al.*, 2000; NUNES *et al.*, 2005; MARQUES *et al.*, 2014).

Os resultados obtidos com a análise da histologia esplênica e a contagem de

CHJ e EI demonstram, em conjunto, o sucesso do modelo experimental de implante esplênico autógeno, evidenciando a recuperação estrutural e funcional da massa esplênica implantado. Estudos prévios revelaram que esse tempo de observação pós-operatória é suficiente também para a recuperação da função imunológica do implante, mostrando o restabelecimento da produção de anticorpos e citocinas nesse período, o que garante uma resposta a infecções semelhante à de animais com baço íntegro (NUNES *et al.*, 2005; LIMA *et al.*, 2008; TEIXEIRA *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2010; PEROBELLI *et al.*, 2011). Estudos em humanos também já demonstraram a eficácia da técnica (PETROIANU e PETROIANU, 2005). Considerando as evidências dos diversos prejuízos apresentados por pacientes esplenectomizados e os bons resultados obtidos com a recuperação morfofuncional do implante esplênico autógeno, a realização dessa técnica deveria ser mais amplamente divulgada e encorajada na prática clínica. Situações em que a preservação total ou parcial do baço em seu sítio anatômico é inviável, como a ruptura esplênica após trauma abdominal, por exemplo, poderiam ser tratadas rotineiramente com esplenectomia total seguida da alocação dos implantes esplênicos em omento maior, com diversos benefícios para o paciente.

Em relação à injúria hepática medicamentosa com paracetamol, os animais foram eutanasiados após 12 ou 24 horas da indução, e foi realizada a dosagem das enzimas hepáticas AST e ALT no soro. Devido à técnica de coleta de sangue empregada, não foi possível descartar que a ocorrência de hemólise possa ter prejudicado a análise desses resultados, especialmente para a AST. Além disso, em estudos prévios que analisaram a dosagem dessas enzimas em modelos de injúria com doses semelhantes de paracetamol, também foi descrita grande variabilidade de resultados (ALEKSUNES *et al.*, 2005; SANZ-GARCIA *et al.*, 2013; IGARASHI *et al.*, 2014). Isso sugere variações ou dificuldades metodológicas, que podem, por exemplo, ser inerentes à via administração do medicamento ou a técnica de coleta de sangue. Apesar de ambas as dosagens terem sido realizadas nesse estudo, os resultados da ALT foram considerados mais apropriados, uma vez que a AST é mais afetada pela hemólise, além de ser menos específica, já que está presente em outros órgãos também (KUGA, 2004; MINCIS e MINCIS, 2006; BASTOS, BERNER e RAMOS, 2010).

Nesse trabalho, os grupos apresentaram comportamentos variáveis, com aumento, manutenção e até mesmo declínio dos valores de ALT entre 12 e 24 horas

da injúria, e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre eles. O aumento da dosagem com 24 horas seria o comportamento esperado em todos os grupos, sugerindo o agravamento da lesão. Como os valores obtidos mostraram grandes variações em cada grupo e entre eles, e devido às dificuldades metodológicas já relatadas, esses resultados não foram utilizados para obter conclusões em relação aos objetivos do trabalho. Além disso, fatores relacionados aos próprios animais podem ter influenciado nessas dosagens, de forma ainda não muito bem compreendida. Mohar e colaboradores (2014) encontraram grandes diferenças entre os valores de ALT entre camundongos machos e fêmeas da linhagem C57BL/6, que acreditam estar associadas à depleção da glutatona e a ligação preferencial da NAPQI a certas proteínas mitocondriais em machos. A não realização de jejum antes da gavagem do paracetamol é outro fator que pode justificar a incongruência desses resultados, visto que poderia contribuir para a variabilidade da lesão (JAESCHKE *et al.*, 2011; VIEIRA, 2014).

Em contrapartida, a análise da histologia hepática revelou alterações compatíveis com a injúria medicamentosa utilizada, com maior gravidade nas amostras analisadas 24 horas após a administração do paracetamol. A presença de necrose centrolobular é a alteração descrita como mais característica nesse modelo, podendo ser notada desde as primeiras horas da injúria, e tornando-se progressivamente mais pronunciada (NEWSOME *et al.*, 2000; IGARASHI *et al.*, 2014). Esse processo acontece após os hepatócitos se tornarem progressivamente intumescidos por uma ação osmótica de balonização, que evolui para ruptura da célula e necrose lítica (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005). Embora alguns estudos tenham sugerido que o processo de morte celular na injúria por paracetamol possa incluir características apoptóticas, não existem evidências de que a apoptose seja um mecanismo relevante de morte celular nesse modelo, não sendo encontradas, por exemplo, alterações histológicas típicas de apoptose como núcleo picnótico, compactação e fragmentação da cromatina e redução do tamanho da célula (JAESCHKE *et al.*, 2011).

No presente estudo, todas as amostras analisadas após 24 horas da injúria apresentavam a necrose centrolobular característica do modelo. Em adição, em algumas amostras do grupo esplenectomizado a necrose era tão intensa que não era possível identificar precisamente a veia centro lobular devido à destruição arquitetural. Esse desarranjo lobular também é característico de processos que

resultam na lesão aguda de hepatócitos, embora não seja específico da hepatite medicamentosa (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005). O colapso dos lóbulos pode estar acompanhado de alterações endoteliais que levam a congestão sinusoidal por colapso da parede de sinusoides e infiltração de eritrócitos, o que também foi observado em algumas amostras com 24 horas de indução da injúria (SANTOS, 2012).

O infiltrado inflamatório estava presente em algumas amostras, porém não foi uma característica marcante dos cortes histológicos, ocorrendo apenas de forma focal e sendo composto, predominantemente, de linfócitos e neutrófilos. Como as células inflamatórias parecem ser mais importantes no processo de remoção dos restos celulares e posterior regeneração do que na lesão fulminante, a ausência de um infiltrado inflamatório pronunciado pode ser explicada pelo tempo de observação (KUMAR, ABBAS e FAUSTO, 2005; JAESCHKE *et al.*, 2011; SANTOS, 2012). Essa explicação é coerente com os resultados obtidos por de Williams e colaboradores (2014), que demonstraram que a ativação de neutrófilos é limitada durante a fase aguda da injúria por paracetamol, estando mais relacionada com a remoção de restos celulares durante a regeneração.

Através da utilização de um escore de pontuação das alterações histológicas mais frequentes, foi possível quantificar o agravamento temporal da injúria hepática, assim como comparar os resultados dos diferentes grupos experimentais. De uma forma geral, as lesões foram mais graves com o maior tempo de exposição à droga. Após 12 horas da injúria medicamentosa não foi observada diferença estatística no escore dos diferentes grupos. Entretanto, com 24 horas da lesão, os valores dos animais esplenectomizados foram maiores do que dos demais, o que sugere uma participação do baço na prevenção desse tipo de injúria. Diversos estudos em modelos animais demonstram que a gravidade da lesão hepática histológica é diretamente proporcional à gravidade das alterações funcionais e à mortalidade (ALEKSUNES *et al.*, 2005; BELARDINELLI, 2008; IGARASHI *et al.*, 2014). Assim, com base nessa correlação já bem estabelecida, pode-se afirmar que é bastante provável que a presença do parênquima esplênico, além de prevenir a lesão histológica do fígado, também minimize a deterioração da função hepática nesse modelo de injúria.

Diversas hipóteses podem ser levantadas para explicar o papel protetor do baço sobre a injúria hepática medicamentosa. Sabe-se que o sistema porta é

responsável pela drenagem sanguínea da maior parte do trato gastrointestinal, incluindo o sangue proveniente do baço e do omento maior. Assim, tanto para o grupo OS quanto para o grupo OM, grande parte do aporte sanguíneo hepático passará primeiramente pelo parênquima esplênico, seja pelo baço íntegro ou pelo implante. É possível, portanto, que a filtração do sangue exercida pelo parênquima esplênico possa influenciar o grau de lesão hepática nesse modelo experimental.

A injúria hepática por paracetamol ainda vem sendo amplamente estudada do ponto de vista imunológico, e diversos aspectos apontam para um importante envolvimento do sistema imune nessa condição. Em estudos experimentais, foi demonstrado que camundongos nocaute para células NK (“natural killer”) são mais susceptíveis à injúria por altas doses de paracetamol, o que parece estar associado a uma transformação acelerada da droga pelo citocromo P450 e uma maior inativação de proteínas citoplasmáticas nos hepatócitos (MARTIN-MURPHY *et al.*, 2013). De forma análoga, camundongos com depleção de células dendríticas sofrem uma maior lesão hepática pelo paracetamol, por mecanismos ainda mal compreendidos, de forma independente das condições de células NK, neutrófilos, citocinas e quimiocinas (CONNOLLY *et al.*, 2011). Sabe-se ainda que a inflamação estéril da injúria por paracetamol é capaz de ativar receptores TLR-4 (“toll-like receptor-4”) em diversos órgãos levando à progressão da insuficiência hepática aguda e a falência de múltiplos órgãos. Assim, camundongos nocaute para TLR-4 apresentam menor lesão hepática e maior sobrevivência, e o uso de antagonistas do TLR-4 leva a uma atenuação da necrose de hepatócitos (SHAH *et al.*, 2013). É importante ressaltar que o baço é um grande reservatório de células do sistema imunológico e um importante local de ativação de receptores TLR (ABBAS, LICHTMAN e PILLAI, 2015). Assim, apesar de não ter sido alvo de investigação desse estudo, com tantas evidências de mecanismos imunológicos envolvidos nesse modelo de injúria hepática, é provável que o baço tenha influência nas lesões do fígado não somente por atuar como órgão de filtração e armazenamento, mas também por ter uma importante função no sistema imunológico.

Outro possível mecanismo de influência do baço na proteção contra a injúria hepática por paracetamol pode envolver o armazenamento de ferro. Existe uma correlação inversa entre os estoques de ferro no baço e no fígado, e existem evidências de que pacientes esplenectomizados devido a doenças metabólicas apresentam uma sobrecarga de ferro hepático (BOHTE *et al.*, 2013). Na injúria por

paracetamol, ocorre inibição da transcrição da hepcidina – um hormônio responsável pela homeostase do ferro no organismo – e um aumento da concentração de ferro hepático (VAN-SWELM *et al.*, 2012). Então, é possível que uma sobrecarga hepática de ferro devido à ausência do parênquima esplênico estabelecida previamente à injúria por paracetamol, possa potencializar ainda mais o mecanismo de lesão induzido por esse medicamento.

Em adição, o papel do baço na regeneração do fígado após uma injúria isquêmica ou uma redução cirúrgica do parênquima hepático também tem sido estudado (CLAVIEN, 2008). Um dos mecanismos pelo qual o baço poderia influenciar nesse processo estaria associado ao armazenamento de plaquetas, que são os maiores carreadores de serotonina no sangue (TARANTINO, 2011). As plaquetas contribuem com reações inflamatórias em muitas formas de dano tecidual, e são atraídas para o fígado durante a lesão de hepatócitos. Em modelos experimentais com injúria hepática por isquemia ou hepatectomia, a serotonina carregada pelas plaquetas mostrou-se essencial para o início da regeneração de hepatócitos (CLAVIEN, 2008). Dessa forma, o baço, enquanto órgão de armazenamento de plaquetas, poderia ter uma influência positiva nesse processo.

Por outro lado, estudos experimentais vêm trazendo evidências de que a esplenectomia é capaz de reduzir a isquemia hepática e a lesão de reperfusão após hepatectomia parcial com oclusão temporária da circulação hepática, melhorando a capacidade regenerativa do fígado (ELSEBAE e ABU-ZEKRI, 2008). Os mecanismos pelos quais a remoção do baço aceleraria a regeneração hepática e inibiria a formação de fibrose ainda não foram totalmente determinados, mas parecem envolver a produção de TGF (transforming growth factor) β 1 pelo baço, que, em outros trabalhos, foi capaz de inibir a recuperação estrutural do fígado (AKAHOSHI *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2015). O TGF β 1 possui efeito inibitório sobre a proliferação de hepatócitos em cultura, por ser capaz de suprimir a produção do fator de crescimento dessas células (CLAVIEN, 2008). Entretanto, o TGF β 1 também estimula a produção de proteínas de matriz extracelular, a tubulogênese e a formação de estruturas neovasculares, e poderia ter um papel importante nas fases mais tardias da regeneração hepática (CLAVIEN, 2008). Portanto, o papel do TGF β 1 na capacidade regenerativa do fígado ainda é controverso e merece ser mais profundamente investigado.

No presente trabalho, não foi possível avaliar a influência do baço sobre a

regeneração hepática no modelo de injúria pelo paracetamol, pois seria necessário um período de observação mínimo de 72 horas. Em estudos futuros, o tempo de observação dos parâmetros histológicos e bioquímicos pode ser ampliado, para que o papel do baço na regeneração hepática possa ser avaliado nesse modelo. Entretanto, a constatação de uma lesão hepática mais grave no grupo esplenectomizado com 24 horas do dano químico já representa um forte argumento para que a relação entre os dois órgãos em termos de lesão e regeneração seja melhor estudada, visto que a correlação entre dano morfológico e funcional está amplamente descrita (ALEKSUNES *et al.*, 2005; BELARDINELLI, 2008; IGARASHI *et al.*, 2014).

Para uma investigação mais ampla do papel protetor do baço nas lesões hepáticas induzidas, a técnica de implante esplênico autógeno poderia ser empregada associada com outros modelos de injúria. Vias alternativas de administração do paracetamol e outras doses poderiam ser consideradas, assim como o uso de outras formas de lesão química, como a galactosamina e o tetracloreto de carbono, além dos modelos de injúria cirúrgica (FERREIRA, 1997; NEWSOME *et al.*, 2000). O metabolismo hepático do paracetamol sofre grandes variações entre espécies, linhagens, sexo, além de situações como jejum e uso de outros medicamentos (JAESCHKE *et al.*, 2011; SANTOS, 2012), o que corrobora a recomendação de que outros modelos precisam ser avaliados para que esse resultado seja considerado definitivo.

Dessa forma, embora a hipótese de que o parênquima esplênico possa ter um papel protetor contra a injúria hepática ainda precise ser mais bem investigada, os resultados desse trabalho sugerem uma importante interação entre o baço e o fígado, e fornecem subsídios para que novos estudos avaliem a correlação entre as funções desses órgãos, utilizando metodologias diversas ou outros modelos experimentais.

6 CONCLUSÕES

Os implantes esplênicos apresentaram uma recuperação estrutural e funcional após 28 dias do procedimento cirúrgico no modelo experimental utilizado, reforçando a eficácia da técnica e demonstrando a capacidade do implante autógeno de resgatar a função de filtração exercida pelo baço íntegro. Além disso, os resultados sugerem que a integridade da função esplênica pode estar associada com a manutenção da morfologia hepática, uma vez que a presença de parênquima esplênico foi capaz de amenizar os efeitos histológicos de uma injúria hepática quimicamente induzida por paracetamol no modelo estudado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. 2015 *Imunologia Celular e Molecular*. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier Editora.

AKAHOSHI, T.; HASHIZUME, M.; TANOUE, K.; SHIMABUKURO, R.; GOTOH, N.; TOMIKAWA, M.; SUGIMACHI, K. 2002. Role of the spleen in liver fibrosis in rats may be mediated by transforming growth factor β -1. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, **17**: 59–65.

ALBERTI, L.R.; VELOSO, D.F.M.; VASCONCELLOS, L.S.; PETROIANU, A. 2012. Is there a relationship between lipids metabolism and splenic surgeries? **Acta Cirúrgica Brasileira**, **27(11)**: 751-756.

ALEKSUNES, L.M.; SLITT, A.M.; CHERRINGTON, N.J.; THIBODEAU, M.S.; KLAASSEN, C.D.; MANAUTOU, J.E. 2005. Differential expression of mouse hepatic transporter genes in response to acetaminophen and carbon tetrachloride. **Toxicological Sciences**, **83(1)**: 44–52.

ALVES, H.J.; VIANA, G.; MAGALHÃES, M.M.; ARANTES, R.M.E.; COELHO, P.M.Z.; CUNHA-MELO, J.R. 1999. Kinetics of neovascularisation of splenic autotransplants in mice. **Journal of Anatomy**, **195(3)**: 387-392.

ANSCHAU, V. 2011. Estresse oxidativo e parâmetros hematológicos como biomarcadores da infecção experimental com *Trypanosoma evansi* em ratos Wistar. [Dissertação]. Lages-SC.

BASTOS, M.S.; BERNER, A.A.; RAMOS, E.R.P. 2010. Avaliação do grau de hemólise e sua interferência em análises bioquímicas de amostras obtidas por diferentes técnicas de coleta de sangue venoso. Anais Eletrônico da V Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica da CESUMAR.

BELARDINELLI, M.C.R. 2008. Efeitos da administração da fração mononuclear de células de medula óssea heteróloga em ratos submetidos à lesão hepática aguda provocada por paracetamol [Tese]. Porto Alegre – RS.

BOHTE, A.E.; VAN-DUSSEN, L.; AKKERMAN, E.M.; NEDERVEEN, A.J.; SINKUS, R.; JANSEN, P.L.M.; STOKER, J.; HOLLAK, C.E.M. 2013. Liver Fibrosis in Type I Gaucher Disease: Magnetic Resonance Imaging, Transient Elastography and Parameters of Iron Storage. **PLoS ONE** **8(3)**: e57507.

BRAGA, A.A.; MALAGÓ, R.; ANACLETO, T.P.; SILVA, C.R.N.; ANDEROLLO, N.A.; FERNANDES, F.L.F. 2012. Histological aspects of autologous transplantation of different fragments of the spleen in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, **27(12)**: 880-884.

BROUSSE, V.; BUFFET, P.; REES, D. 2014. The spleen and sickle cell disease: the sick(led) spleen. **British Journal of Haematology**, **166(2)**: 165–176.

- CAMPOS-CHRISTO, M. 1959. Esplenectomias parciais regradas. **O Hospital**, **56(4)**: 93-8.
- CASPER, J.T.; KOETHE, S.; RODEY, G.E.; THATCHER, L.G. 1976. A new method for studying splenic reticuloendothelial dysfunction in sickle cell disease patients and its clinical application: a brief report. **Blood**, **42(2)**: 183-8.
- CHAUFFAILLE, M.L.L.F. 2002. Funções do remanescente esplênico (comentário). **Revista da Associação Médica Brasileira**, **48(1)**: 1-25.
- CLAVIEN, P.A. 2008. Liver regeneration: a spotlight on the novel role of platelets and serotonin. **Swiss Medical Weekly** **138(25-26)**: 361-370.
- CONNOLLY, M.K.; AYO, D.; MALHOTRA, A.; HACKMAN, M.; BEDROSIAN, A.S.; IBRAHIM, J.; CIEZA-RUBIO, N.E.; NGUYEN, A.H.; HENNING, J.R.; DORVIL-CASTRO, M.; PACHTER, H.L.; MILLER, G. 2011. Dendritic cell depletion exacerbates acetaminophen hepatotoxicity. **Hepatology**, **54(3)**: 959-968.
- CORAZZA, G.R.; GINALDI, L.; ZOLI, G.; FRISONI, M.; LALLI, G.; GASBARRINI, G.; QUAGLINO, D. 1990. Howell-Jolly body counting as a measure of splenic function. A reassessment. **Clinical & Laboratory Haematology**, **12(3)**: 269-75.
- DUGAN, L.; LEECH, L.; SPERONI, K.G.; CORRIHER, J. 2005. Factors affecting hemolysis rates in blood samples drawn from newly placed IV sites in the emergency department. **Journal Of Emergency Nursing**, **31(4)**: 338-345.
- ELSEBAE, M.M.A.; ABU-ZEKRI, N.B. 2008. Effect of Splenectomy on Remaining Liver Function after Hepatic Resection with Inflow-Outflow Occlusion: Experimental Study. **Kasr El Aini Journal of Surgery**, **9(2)**: 39-44.
- FERNANDES, B.F.; REZENDE, A.B.; ALVES, C.C.S.; TEIXEIRA, F.M.; FARIAS, R.E.; FERREIRA, A.P.; TEIXEIRA, H.C. 2010. Splenic autotransplantation restores IL-17 production and antibody response to *Streptococcus pneumoniae* in splenectomized mice. **Transplant Immunology**, **22(3-4)**: 195-197.
- FERREIRA, F.M. 1997. Avaliação estrutural do parênquima hepático através da histologia e tomografia computadorizada em cães intoxicados experimentalmente pelo tetracloreto de carbono. [Dissertação] Curitiba-PR.
- FREITAS, S.H.; DÓRIA, R.G.S.; MENDONÇA, F.S.; EVÊNCIO NETO, J.; SIMÕES, M.J.; CAMARGO, L.M. 2010. Aspectos histológicos de fragmentos esplênicos autotransplantados em ratos. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, **62(3)**: 639-644.
- IGARASHI, I.; MAEJIMA, T.; KAI, K.; ARAKAWA, S.; TERANISHI, M.; SANBUISHO, A. 2014. Role of connexin 32 in acetaminophen toxicity in a knockout mice model. **Experimental and Toxicologic Pathology**, **66(2-3)**: 103-110.
- JAESCHKE, H.; MCGILL, M.R.; WILLIAMS, C.D.; RAMACHANDRAN, A. 2011. Current issues with acetaminophen hepatotoxicity—a clinically relevant model to test

the efficacy of natural products. **Life Sciences**, **88(17-18)**: 737–745.

JAMES, L.P.; MAYEUX, P.R.; HINSON, J.A. 2003. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Drug Metabolism And Disposition**, **31(12)**: 1499-1506.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. 2013. Histologia Básica: Texto e Atlas. São Paulo (SP): Editora Guanabara Koogan. Capítulo 16 – Órgãos Associados ao Trato Digestivo, p311-332.

KESTERING, D.M.; D'ACAMPORA, A.J.; FARIAS, D.C.; BRUM, S.P.B.; ELY, J.B. 2005. Resistência de ratos à peritonite fecal quando submetidos a esplenectomia e auto-implante do baço no retroperitônio. **Acta Cirúrgica Brasileira**, **20(6)**: 473-477.

KIM, H.Y.; JIN, E. H.; KIM, W.; LEE, J. Y.; WOO, H.; OH, S.; SEO, J.; SANG, H. CHUNG, K. H.; JUNG, Y. J.; KIM, D.; KIM, B. G.; LEE, K. L. 2015. The Role of Spleen Stiffness in Determining the Severity and Bleeding Risk of Esophageal Varices in Cirrhotic Patients. *Medicine Observational Study*, **94(24)**: 1-8.

KING, H.; SHUMACKER, H.B. 1952. Splenic studies. I. Susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. **Annals of Surgery**, **136(2)**: 239–242.

KUGA, M. T. 2004. Efeito hepatoprotetor da Curcuma zedoaria induzida pelo paracetamol em ratos machos tipo Wistar [Dissertação]. São José dos Campos-SP.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. 2005. Patologia – Bases Patológicas das Doenças. São Paulo (SP): Elsevier Editora. Capítulo 18 O Fígado e as Vias Biliares p919-982.

LAMMERS, A.J.J.; PORTO, A.P.N.A.; BENNINK, R.J.; VAN LEEUWEN, E.M.M.; BIEMOND, B.J.; GOSLINGS, C.; VAN MARLE, J.; TEN BERGE, I.J.M.; SPEELMAN, P.; HOEKSTRA, J.B.L. 2012. Hyposplenism: Comparison of different methods for determining splenic function. **American Journal of Hematology**, **87(5)**: 484–489.

LEE, S. C.; JEONG, H. H.; CHOI, B.; KIM, S. 2015. Role of the spleen in liver regeneration in relation to transforming growth factor-b1 and hepatocyte growth factor. **Journal of Surgical Research**, **196**: 270-277.

LIMA, I.F.S.; REZENDE, A.B.; ALVES, C.C.S.; PEROBELLI, S.M.; FERNANDES, B.F.; SOUZA, M.A.; FERREIRA, A.P.; TEIXEIRA, H.C. 2008. Influência da esplenectomia e do autotransplante de baço na produção de anticorpos e citocinas após infecção por *Leishmania Chagasi*. **Principia Caminhos da Iniciação Científica**, **1**: 66-77.

MARQUES, R.G.; PETROIANU, A.; COELHO, J.M.C.O.; PORTELA, M.C. 2002. Regeneration of splenic autotransplants. **Annals of Hematology**, **81(11)**: 622–626.

MARQUES, R.G.; PETROIANU, A. 2003a. O papel do baço na resistência à infecção. **Revista Brasileira de Medicina**, **60(5)**: 271-273.

MARQUES, R.G.; PETROIANU, A. 2003b. Infecção fulminante pós-esplenectomia.

Arquivos de Gastroenterologia, 40(1): 47-54.

MARQUES, R.G.; PETROIANU, A.; COELHO, J.M.C. 2003. Bacterial phagocytosis by macrophage of autogenous splenic implant. **Brazilian Journal of Biology, 63(3): 491-495.**

MARQUES, R.G.; CAETANO, C.E.R.; DIESTEL, C.F.; LIMA, E.; PORTELA, M.C.; OLIVEIRA, A.V.; OLIVEIRA, M.B.N.; BERNARDO-FILHO, M. 2012. Critical mass of splenic autotransplant needed for the development of phagocytic activity in rats. **Clinical and Experimental Immunology, 170(1): 77-85.**

MARQUES, R.G.; LUCENA, S.B.S.G.; CAETANO, C.E.R.; OLIVEIRA DE SOUSA, V.; PORTELA, M.C.; PETROIANU, A. 2014. Blood clearance of Howell–Jolly bodies in an experimental autogenic splenic implant model. **British Journal of Surgery, 101(7): 820–827.**

MARTIN-MURPHY, B.V.; KOMINSKY, D.J.; ORLICKY, D.J.; DONOHUE, T.M.; JU, C. 2013. Increased susceptibility of natural killer T cell deficient mice to acetaminophen-induced liver injury. **Hepatology, 57(4): 1575–1584.**

MARTINI, F.H.; TIMMONS, M.J.; TALLITSCH, R.B. 2012. Human Anatomy 7th Edition. New York (NY): Pearson Education Inc. Chapter 25: The Digestive System.

MEBIUS, R.E.; KRAAL, G. 2005. Structure and function of the spleen. **Nature Reviews Immunology, 5(8): 606-616.**

MIKO, I.; BRATH, E.; FURKA, I.; KOVACS, J.; KELVIN, D.; ZHONG, R.. 2001. Spleen autotransplantation in mice: a novel experimental model for immunology study. **Microsurgery, 21(4): 140–142.**

MIKO, I.; BRATH, E.; NEMETH, N.; TOTH, F.F.; SIPKA, S.; KOVACS, J.; SIPKA, S.; FACHET, J.; FURKA, A.; FURKA, I.; ZHONG, R. 2003. Hematological, hemorheological, immunological, and morphological studies of spleen autotransplantation in mice: preliminary results. **Microsurgery, 23(5): 483–488.**

MIKO, I.; BRATH, E.; NEMETH, N.; FURKA, A.; SIPKA JR., S.; PETO, K.; SERFOZO, J.; KOVACS, J.; IMRE, S.; BENKO, I.; GALUSKA, L.; SIPKA, S.; ACS, G.; FURKA, I.. 2007. Spleen Autotransplantation. Morphological and functional follow-up after spleen autotransplantation in mice: a research summary. **Microsurgery 27(4): 312–316.**

MINCIS, M.; MINCIS, R. 2006. Enzimas hepáticas: aspectos de interesse prático. **Revista Clínica e Terapêutica, 32(2): 56-60.**

MOHAR, I.; STAMPER, B.D.; RADEMACHER, P.M.; WHITE, C.C.; NELSON, S.D.; KAVANAGH, T.J. 2014. Acetaminophen-induced liver damage in mice is associated with gender-specific adduction of peroxiredoxin-6. **Redox Biology, 2: 377–387.**

NEDER, A.M. 1958. Estudo anatômico sobre as zonas venosas lienais e sua drenagem no homem [Tese]. Belo Horizonte-MG.

- NEWSOME, P.N.; PLEVRIS, J.N.; NELSON, L.J.; HAYES, P.C. 2000. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation. **Liver Transplantation**, **6(1)**: 21-31.
- NUNES, S. I.; REZENDE, A.B.; TEIXEIRA, F.M.; FERREIRA, A.P.; ALVES, M.M.J.; JAMEL. N.; ASSIS, R.V.C.; TEIXEIRA, H.C. 2005. Antibody Response of Autogenous Splenic Tissue Implanted in the Abdominal Cavity of Mice. **World Journal of Surgery**, **29(12)**: 1623–1629.
- PAULO, I.C.A.L.; SILVA, A.L.; PIRAS, C.; RAMOS, B.F.; ZANETTI, F.R.; PAULO, D.N.S. 2010. Aspectos morfológicos e funcionais dos autoimplantes esplênicos em ratos tratados com oxigênio hiperbárico. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, **37(3)**: 226-233.
- PEROBELLI, S.M.; ALVES, C.C.S.; REZENDE, A.B.; FARIAS, R.E.; NUNES, S.I.; TEIXEIRA, H.C. 2011. Splenic autotransplantation reverses interferon-gamma and nitric oxide production and resistance to *Listeria monocytogenes* in splenectomized mice. **Transplant Infectious Disease**, **13(2)**: 154-160.
- PETROIANU, A. 2003. O Baço – Ciências Básicas, Propedêutica, Clínica, Cirurgia. São Paulo (SP): CLR Baliero Editores.
- PETROIANU, A.; PETROIANU, L.P.G. 2005. Splenic autotransplantation for Treatment of portal hypertension. **Canadian Journal of Surgery**, **48(5)**: 382-386.
- PETROIANU, A.; VELOSO, D.F.M.; COSTA, G.R.; ALBERTI, L.R. 2006. Efeitos de operações sobre o baço no lipidograma de ratas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, **52(1)**: 56-59.
- PORTO, A.P.N.A.; LAMMERS, A.J.J.; BENNINK, R.J.; TEN BERGE, I.J.M.; SPEELMAN, J.; HOEKSTRA, J.B.L. 2010. Assessment of splenic function. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, **29(12)**: 1465–1473.
- RESENDE, V.; PETROIANU, A.; JUNIOR, W.C.T. 2002. Autotransplantation for treatment of severe splenic lesions. **Emergency Radiology**, **9(4)**: 208–212
- RESENDE, V.; PETROIANU, A. 2002. Funções do remanescente esplênico após esplenectomia subtotal para o tratamento de lesões complexas do baço humano. **Revista da Associação Médica Brasileira**, **48(1)**: 26-31.
- RESENDE, V.; PETROIANU, A. 2003. Functions of the splenic remnant after subtotal splenectomy for treatment of severe splenic injuries. **The American Journal of Surgery**, **185(4)**: 311–315.
- REZENDE, A.B.; NETO, N.N.; FERNANDES, L.R.; RIBEIRO, A.C.; ALVAREZ-LEITE, J.I.; TEIXEIRA, H.C. 2011. Splenectomy increases atherosclerotic lesions in apolipoprotein E deficient mice. **The Journal of Surgical Research**, **171(2)**: e231-236.

ROGERS, D.W.; SERJEANT, B.E.; SERJEANT, G.R. 1982 Early rise in 'pitted' red cell count as a guide to susceptibility to infection in childhood sickle cell anaemia. **Archives of Disease in Childhood**, **57(5)**: 338-342.

SANTOS, F.M. 2012. Potencial terapêutico da s-nitrosoglutationa (GSNO) na insuficiência hepática aguda experimental induzida por paracetamol [Dissertação]. Salvador-BA.

SANZ-GARCIA, C.; FERRER-MAYORGA, G.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, A.; VALVERDE, A.M.; MARTIN-DUCE, A.; VELASCO-MARTIN, J.P.; REGADERA, J.; FERNANDEZ, M. ALEMANY, S. 2013. Sterile inflammation in acetaminophen-induced liver injury is mediated by Cot/tpl2. **The Journal of Biological Chemistry**, **288(21)**: 15342–15351.

SCHNITZER, B.; SODEMAN, T.; MEAD, M.L.; CONTACOS, P.G. 1972. Pitting Function of the Spleen in Malaria: Ultrastructural Observations. **Science**, **177(4044)**: 175-177.

SHAH, N.; OCA, M.M.; JOVER-COBOS, M.; TANAMOTO, K.; MUROI, M.; SUGIYAMA, K.; DAVIES, N.A.; MOOKERJEE, R.P.; DHAR, D.K.; JALAN, R. 2013. Role of Toll-Like Receptor 4 in mediating multiorgan dysfunction in mice with acetaminophen induced acute liver failure. **Liver Transplantation**, **19**: 751–761.

SILVA, P.E.M.P. 2012. Colaboração entre quimiocinas e peptídeos mitocondriais no recrutamento e ativação de neutrófilos durante a lesão hepática estéril [Dissertação]. Belo Horizonte-MG.

SOUSA, V.O. 2011. Regeneração do autoimplante esplênico em ratos: avaliação Morfofuncional e imuno-histoquímica [Dissertação]. Rio de Janeiro-RJ.

TARANTINO, G. 2011. Spleen: a new hole for an old player? **World Journal of Gastroenterology**, **17(33)**: 3776-3784.

TARANTINO, G.; SCALERA, A.; FINELLI, C. 2013. Liver-spleen axis: Intersection between immunity, infections and metabolism. **World Journal of Gastroenterology**, **19(23)**: 3534-3542.

TEIXEIRA, F.M.; FERNANDES, B.F.; REZENDE, A.B.; MACHADO, R.R.P.; ALVES, C.C.S.; PEROBELLI, S.M.; NUNES, S.I.; FARIAS, R.E.; RODRIGUES, M.F.; FERREIRA, A.P.; OLIVEIRA, S.C.; TEIXEIRA, H.C. 2008. *Staphylococcus aureus* infection after splenectomy and splenic autotransplantation in BALB/c mice. **Clinical and Experimental Immunology**, **154(2)**: 255-263.

TORRES, O.J.M.; MACEDO, E.L.; PICCIANI, E.R.G.; NUNES, P.M.S.; COSTA, J.V.G.; CARVALHO, A.B.; LOBATO JUNIOR, P.S. 2000. Estudo histológico da regeneração esplênica de ratos submetidos a esplenectomia subtotal. **Acta Cirúrgica Brasileira**, **15(2)**: 107-114.

VAN-SWELM, R.P.L.; LAARAKKERS, C.M.M.; BLOUS, L.; PETERS, J.G.P.; DAVIDSON, E.N.B.; VAN-DER-KRAAN, P.M.; SWINKELS, D.W.; MASEREEUW, R.;

RUSSEL, F.G.M. 2012. Acute Acetaminophen Intoxication Leads to Hepatic Iron Loading by Decreased Hepcidin Synthesis. **Toxicological Sciences**, **129(1)**: 225–233.

VIEIRA, B.N. 2014. Padronização de dose de tetracloreto de carbono em modelo de lesão hepática aguda por estresse oxidativo em ratos Wistar [Dissertação]. Goiânia-GO.

WILKINS, B.S. 2002. Historical review – The spleen. **British Journal of Haematology**, **117**: 265–274.

WILLIAMS, D.; BAJT, M.L.; SHARPE, M.R.; MCGILL, M.R.; FARHOOD, A.; JAESCHKE, H. 2014. Neutrophil activation during acetaminophen hepatotoxicity and repair in mice and humans. **Toxicology and Applied Pharmacology**, **275(2)**: 122–133.

ZAPPALÁ, A. 1958. Estudo anatômico da divisão terminal da artéria lienal: zonas arteriais do baço [Tese de Livre-docência]. Belo Horizonte-MG.

ZHOU, L.; CHEN, T.; ZHANG, X.; LI, C.; YANG, Z.; ZENG, N.; WANG, L.; LI, T.; LI, J.; LI, C.; LI, L.; XIE, X. 2013. Spleen Dynamic Contrast-Enhanced Magnetic Resonance Imaging as a New Method for Staging Liver Fibrosis in a Piglet Model. **PLOS One**, **8(12)**: 1-7.

ZOLI, G.; CORAZZA, G.R.; WOOD, S.; BARTOLI, R.; GASBARRINI, G.; FARTHING, M.J.G. 1998. Impaired splenic function and tuftsin deficiency in patients with intestinal failure on long term intravenous nutrition. **Gut**, **43(6)**: 759–762.