

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA E ANATOMIA**

**Estudo da excreção hepatobiliar, do refluxo enterobiliar e da reparação hepática em ratos com obstrução biliar crônica submetidos à derivação biliojejunal com descompressão da alça jejunal exclusiva.**

**DOCTORANDO**

**Rafel Kemp**

**COLABORADORES**

Wembertom Martins

Robson oliveira Dutra

Luciano Neder

**ORIENTADOR**

José Sebastião dos Santos

**RIBEIRÃO PRETO**

**2008**

## **Estudo da excreção hepatobiliar, do refluxo enterobiliar e da reparação hepática em ratos com obstrução biliar crônica submetidos à derivação biliojejunal com descompressão da alça jejunal exclusiva.**

A obstrução biliar extra-hepática crônica induz à proliferação ductal, à fibrose e à cirrose hepática que se acompanham de hipertensão portal e insuficiência hepatocelular, no homem (LESUR et al,1993; AFROUDAKIS et al,1981) e, em animais de experimentação (KONTOURAS et al, 1984; GROSS et al , 1987). A fibrose e a hipertensão portal aparecem após duas semanas de obstrução biliar, em ratos, enquanto o desenvolvimento de lesões compatíveis com cirrose, usualmente, ocorre após 4 semanas (KONTOURAS et al, 1984, KRÄHENBÜHL et al, 1998).

O quadro histopatológico de fibrose biliar secundária é caracterizado pelo aparecimento da proliferação dos canálculos biliares, do desenvolvimento de fibrose e da presença de infiltrado mononuclear nos espaços portais. Neste estágio da doença, há preservação das relações vasculares entre o espaço porta e a veia hepática. A persistência do quadro obstrutivo induz à fragmentação do parênquima hepático e o surgimento de nódulos parenquimatosos, caracterizando, assim, a cirrose biliar secundária (KONTOURAS et al, 1984; GROSS et al , 1987) .

Na prática clínica, a fibrose e a cirrose biliar secundária são, freqüentemente, consideradas como estágio final e irreversível da lesão hepática (FRIEDMAN, 1993). Por outro lado, há registros clínicos (YEONG et al. 1982; HAMMEL et al. 2001) e experimentais (ABEL AZIZ et al, 1990, ZIMMERMANN et al. 1992, ARONSON et al., 1993; SANTOS et al. 1998; PANDOLFI et al. 2001) demonstrando que a descompressão biliar efetiva promove reversão das alterações histológicas do fígado.

A escolha da modalidade de derivação biliar a ser empregada na colestase extra-hepática depende da natureza da afecção, da idade e das condições gerais do paciente sendo mais importante a experiência do cirurgião do que a patogênese da doença tratada (UCHIYAMA et al. 2003). Embora, os resultados das anastomoses biliodigestivas para as doenças benignas sejam, usualmente excelentes pode ocorrer proliferação bacteriana, refluxo enterobiliar e colangite em até 22% dos pacientes (PLAISIER et al. 2001) e uma pequena, mas significativa minoria de pacientes pode ficar incapacitada, em função dos episódios de colangite recorrente (MATTEWS et al,1993) A circulação livre do conteúdo entérico para a via biliar pode provocar episódios transitórios de obstrução mecânica. Esses mecanismos

podem justificar a persistência da elevação da fosfatase alcalina nos animais submetidos à derivação bilioduodenal (DBD) e a presença de alimentos na via biliar na quase totalidade de animais tratados (SANTOS et al,1996), bem como os episódios transitórios de colangite registrados no homem, sem indícios de obstrução mecânica (DUCROTTE et al,1991, HASHIMOTO e OKYANAGI,2000, HASHIMOTO et al, 2005)

As repercussões sobre o fígado e as vias biliares dos procedimentos endoscópicos e cirúrgicos empregados para promover a desobstrução da via biliar têm sido objeto de avaliação (ZIMMERMANN et al. 1992; SANTOS et al. 1998; HASHIMOTO e OHYANAGI, 2000; PANDOLFI et al. 2001; SANTOS et al, 2005; DUTRA et al, 2007).

A DBD tem sido utilizada em pacientes idosos, reservando-se a derivação biliojejunal em Y de Roux (DBJ) para pacientes jovens com expectativa de vida de 10 anos ou mais (ESCUADERO-FABRE et al. 1991). Em contrapartida, PANIS et al. (1993) relataram que a DBD deva ser indicada sempre que possível, inclusive em pacientes jovens e com doença benigna. A DBD é empregada como procedimento de escolha na reconstrução da via biliar após lesões traumáticas, iatrogênicas ou estenoses benignas. É mais fisiológica e tecnicamente mais rápida e fácil de ser realizada (HASHIMOTO e OHYANAGI, 2000). Além disso, permite o acesso da via biliar à exploração endoscópica (PANIS et al., 1933). Com o advento da abordagem por videolaparoscopia tem ocorrido uma maior flexibilização da sua indicação no tratamento da obstrução biliar.

Na DBD existe a presença dos resíduos alimentares que podem acumular no colédoco distal e sua associação com o refluxo enterobiliar e conseqüentemente, a colangite ascendente (STEFANINI et al., 1974). Entretanto, se a anastomose é ampla e sem estenoses, a presença de restos alimentares no colédoco distal será intermitente, e não propiciará sintomas. O risco de colangite após DBD está relacionado a processos obstrutivos variando entre zero e 6% (PANIS et al., 1993).

César Roux publicou em 1897, a “Gastroenterostomia Posterior por Implantação”, em 32 pacientes com obstrução da via de saída do estômago. Roux defendeu esta cirurgia por muitos anos, porém, observou um grande número de complicações, abandonando a técnica em 1911. A alça em Y ficou praticamente sem uso por cerca de 40 anos, até que nas décadas de 50 e 60 do século XX, anos após a morte de César Roux, o Y foi proposto para cirurgias das vias biliares, do pâncreas, do fígado e do trato digestório (BESSON, 1985).

A DBJ é revestida de maior complexidade técnica, além de dificultar o acesso da via biliar, após a cirurgia, por meios endoscópicos. No acompanhamento a curto e em longo prazo, não houve diferença de resultados entre DBD e DBJ em relação ao aparecimento de

colangite (PANIS et al., 1993).

HASHIMOTO E OHYANAGI (2000), em estudo clínico, compararam a evolução da DBJ e da DBD, em oito e cinco pacientes, respectivamente, acompanhados em média 4,5 anos (1-5 anos) e 2,5 anos (1-3 anos). Houve um caso de colangite (12%) no grupo DBJ. Houve estase biliar na alça jejunal em Y de Roux, com retardo significativo do fluxo de bile até o jejuno proximal ( $65\pm 5$  min) em comparação ao tratamento com DBD ( $35\pm 5$  min) e as pessoas saudáveis ( $40\pm 5$  min). Sugeriram que a estase biliar e a pressão aumentada na alça exclusiva podem causar refluxo, colangite e danos hepáticos permanentes. Concluíram, então, que a DBD é mais fisiológica e com menor índice de complicações que a DBJ, desde que seja uma anastomose ampla e que permita um fluxo adequado de bile para o intestino.

SANTOS et al.(1996) observaram que a reparação da arquitetura hepática, em ratos com cirrose biliar secundária, após a DBD, ocorreu em 70% dos animais e as alterações bioquímicas e hematimétricas normalizaram-se após um mês da desobstrução. Nos 30% dos animais restantes, observou-se recuperação parcial da arquitetura hepática, com fibrose hepática residual e infiltrado inflamatório. Nestes animais foram encontrados restos alimentares ocupando a anastomose bilioduodenal formando bezoares, mesmo em anastomoses amplas. Os autores concluíram que o refluxo enterobiliar (REB) propiciou o aparecimento de colangite com influência na recuperação morfofuncional do fígado.

Em estudo comparando os efeitos da DBD e DBJ, em ratos, com cirrose biliar secundária foi observada a presença de resíduos alimentares nas anastomoses biliodigestivas com contaminação da bile por germes entéricos e colangite. A DBJ teve melhor desempenho na recuperação da arquitetura hepática, provavelmente, em decorrência da maior intensidade do refluxo enterobiliar (REB), da contaminação biliar e do processo inflamatório ocorrido na DBD. Porém, os dois procedimentos foram equivalentes na capacidade de promover a recuperação da colestase, do metabolismo energético do fígado e da reversão da esplenomegalia (SANTOS et al., 1996).

Estudo em ratos, com obstrução biliar e fibrose biliar secundária, tratados com DBD e DBJ em Y de Roux, com alças exclusivas de 5, 10 e 15 cm, demonstrou melhor desempenho na reparação das alterações histopatológicas do parênquima hepático e na normalização do metabolismo energético do fígado na derivação com alça em Y de 15 cm, que corresponderia a uma alça de cerca de 40 cm no homem. Desta forma, reforça-se a importância de minimizar o contato do conteúdo entérico com a via biliar (PANDOLFI et al. 2001).

Cerca de 10 a 15% dos pacientes com DBJ podem evoluir com síndrome da alça cega e colangite. Estes sintomas podem ser decorrentes das obstruções mecânicas, porém nos casos

em que estas complicações são afastadas, um obstáculo funcional secundário a ruptura da propagação dos potenciais de marcapasso originados no duodeno podem ocasionar estase e colangite (KLAUS et al., 2001)

Após o tratamento com DBD e DBJ em ratos submetidos à obstrução biliar (DUTRA et al, 2006) observou que função hepatocelular avaliada pela cintilografia hepática dinâmica foi melhor na DBD. O refluxo enterogástrico esteve presente nas duas derivações, sem diferenças entre elas. Apesar de, na DBD não ter ocorrido uma completa recuperação morfológica no fígado, no período de tempo estudado, estas alterações não foram decisivas para prejudicar a excreção hepática. Provavelmente, na DBD, o refluxo enterobiliar e a estase na via biliar ocorrem transitoriamente, de forma intermitente e com baixa pressão nos ductos biliares, preservando assim, a excreção hepatocelular.

Na DBJ, os distúrbios motores na alça exclusiva podem propiciar uma estase permanente, com elevação da pressão na via biliar. A estase pode evoluir com proliferação bacteriana (VAN TRAPPEN et al. 1977) e translocação para o fígado (CHUANG et al. 1998), além de promover a passagem de bactérias pelos hepatócitos, com destruição das junções celulares e o aparecimento de colangite (TOYOTA et al. 1984). Além disto, a elevação mantida da pressão na via biliar propiciaria uma diminuição do metabolismo energético das mitocôndrias hepáticas (KRAHENBUHL et al., 1988), comprometendo a função hepática e retardando a excreção biliar. Isto posto, os autores recomendaram que a DBD deva ser priorizada, sempre que possível, devido a sua facilidade e simplicidade técnica e não apresentar as complicações inerentes da alça exclusiva em Y de Roux.

Com a intenção de minimizar as complicações provenientes da alça exclusiva do Y de Roux foi proposta a sua descompressão por meio de uma anastomose duodeno-jejunal (DBJ-DJ) por HASHIMOTO et al. 2005. Neste estudo clínico observou-se que a colangite de refluxo pós-operatória ocorreu em 14% dos pacientes submetidos à DBJ, em contrapartida nenhum paciente submetido à DBJ-DJ apresentou sinais de colangite. A cintilografia hepatobiliar demonstrou estase proeminente da bile na alça exclusiva do Y de Roux, assim com atraso significativo do tempo para a visualização do radiofármaco no jejuno proximal nos pacientes submetidos a DBJ. (DBJ –  $65 \pm 5$  min; DBJ-DJ –  $45 \pm 5$  min; Controle –  $40 \pm 5$  min). Desta forma os autores concluem que a derivação biliojejunal com anastomose duodeno-jejunal látero-lateral é mais fisiológica, apresenta menor número de complicações pós-operatórias além de permitir o acesso endoscópico à área de anastomose biliodigestiva e à via biliar intra-hepática.

Nesse cenário, pode se afirmar que não há consenso sobre a modalidade de derivação

biliodigestiva mais adequada para o tratamento da obstrução biliar extra-hepática. A presença do refluxo enterobiliar na DBD e os distúrbios motores existentes na DBJ podem ocasionar estase, proliferação bacteriana e colangite. Esses fenômenos justificam o estudo da influência das diferentes modalidades de derivação biliar sobre o parênquima hepático e a função excretora do fígado, na perspectiva de identificar o tratamento que produz menos efeitos adversos, bem como explorar novas modalidades técnicas para correção da obstrução biliar extra-hepática.

Desta forma, o objetivo deste estudo é quantificar o refluxo enterobiliar e o fluxo hepatobiliointestinal na DBD, DBJ e na DBJ-DJ por meio de métodos cintilográficos, e avaliar comparativamente a influência da derivação biliar no processo de reparação das lesões morfo-funcionais e metabólicas do fígado de ratos com obstrução biliar extra-hepática crônica.

---

## **Material e Métodos**

O projeto será desenvolvido nos Laboratórios de Técnica Cirúrgica e Cirurgia Experimental, de Medicina Nuclear e de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

### **ANIMAIS DE EXPERIMENTAÇÃO**

Serão utilizados 120 ratos machos adultos de pelagem albina da linhagem Wistar e com pesos variando entre 250 e 300 gramas, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

Os animais serão acondicionados em gaiolas de polipropileno com tampa de metal fenestrada com divisórias para ração e água, em grupos de cinco animais por gaiola, mantidos com ração padrão e água *ad libitum* e em sala com temperatura ambiente e iluminação natural.

### **DISTRIBUIÇÃO E A LOCAÇÃO DOS ANIMAIS EM GRUPOS E SUBGRUPOS**

Após um período de adaptação e quando atingirem o peso adequado, os animais serão divididos em 2 grupos, conforme ilustra a FIGURA 1.

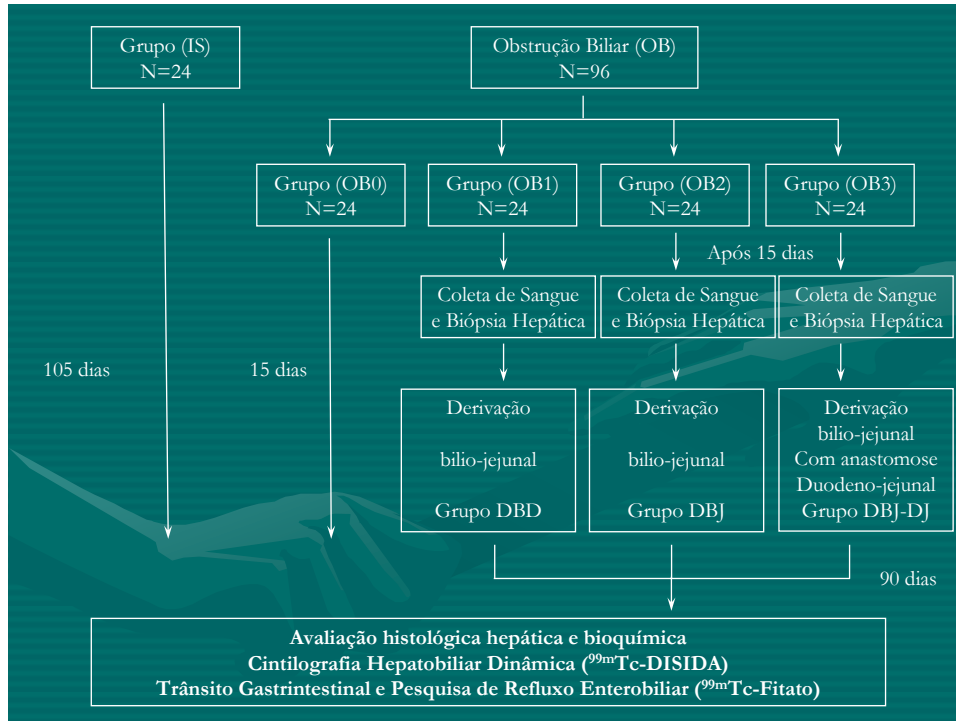
- Grupo controle (IS): 24animais
- Grupo com obstrução biliar (OB): 96 animais

O grupo IS com 24 animais normais será submetido à coleta de sangue para avaliação bioquímica e retirada de fragmento do lobo inferior esquerdo do fígado para análise histológica. O trânsito gastrintestinal, o REB e a função hepatobiliar serão quantificados por meio de métodos cintilográficos com os radioisótopos Fitato  $^{99m}\text{Tc}$  e o Disida  $^{99m}\text{Tc}$ , respectivamente.

O grupo OB, formado por 96 animais com 15 dias de obstrução biliar, será distribuído em quatro subgrupos (OB0, OB1, OB2, OB3) com 24 animais cada. O subgrupo OB0 será submetido à coleta de sangue para avaliação bioquímica, a retirada de fragmento do lobo inferior esquerdo do fígado para análise histológica, além do trânsito gastrintestinal com Fitato  $^{99m}\text{Tc}$  e ao fluxo hepatobiliointestinal com Disida  $^{99m}\text{Tc}$ . Os animais dos subgrupos OB1, OB2 e OB3 após 15 dias de obstrução biliar, serão submetidos à coleta de sangue para avaliação bioquímica do sangue, a retirada de fragmento do lobo inferior esquerdo do fígado para análise histológica, e a seguir, submetidos à derivação bilioduodenal, derivação biliojejunal em Y de Roux e derivação bilio-jejunal em Y de Roux com anastomose duodeno-jejunal, e passarão a ser denominados, respectivamente, de DBD, DBJ e DBJ-DJ. Cerca de 90 dias após as derivações serão realizados os estudos do REB e trânsito gastrintestinal com Fitato  $^{99m}\text{Tc}$  e do fluxo hepatobiliointestinal com Disida  $^{99m}\text{Tc}$ , além da coleta de sangue para avaliação bioquímica do sangue e da retirada de fragmento do lobo inferior esquerdo do fígado para análise histológica.

## Delineamento Experimental

Figura 1: Delineamento do Experimento.





## ANESTESIA

O anestésico utilizado será o pentobarbital 40-60 mg/Kg intraperitoneal,; os animais serão mantidos em respiração espontânea, em plano anestésico adequado, para os procedimentos cirúrgicos. Para a quantificação do REB os animais serão mantidos acordados durante os tempos pré-determinados nos grupos (15 minutos e 4 horas) e anestesiados com tiopental sódico 40 mg/kg intraperitoneal no momento da separação das peças cirúrgicas. O tiopental intraperitoneal será utilizado para o estudo do fluxo hepatobiliointestinal .

## TÉCNICA OPERATÓRIA

Cada animal será pesado, higienizado e anestesiado sendo, a seguir, posicionado em decúbito dorsal e submetido à tricotomia da parede anterior do abdome. A anti-sepsia será feita com solução de polivinil pirrolidona iodo (Dermodine, J.P. Indústria Farmacêutica S.A. Ribeirão Preto). O acesso à cavidade abdominal será por laparotomia mediana, interessando o abdome superior sendo as bordas afastadas lateralmente por afastadores delicados. A cavidade peritoneal será mantida constantemente úmida com solução fisiológica, para se evitar o ressecamento das vísceras.

No grupo controle (IS) os animais serão submetidos à operação simulada, tracionando-se o duodeno e manipulando cuidadosamente a via biliar, para se evitar traumas. Após 105 dias, serão realizadas as avaliações bioquímicas, histológicas e cintilográficas com Fitato e Disida.

No grupo de obstrução biliar (OB) ( 96 animais), após a identificação e exposição do ducto biliar proceder-se-á a sua ligadura à aproximadamente 5mm de sua bifurcação, com 5 nós de fio prolene 5-0 (prolene suture-blue monofilament Ethicon, Inc.), envolvendo-se o ducto biliar comum até 3 mm acima da junção biliopancreática, onde far-se-á outra ligadura com 5 nós (CASTRO E SILVA jr. et al., 1995). Após 15 dias, serão realizadas as avaliações bioquímicas, histológicas e cintilográficas com Fitato e Disida.

Nos animais DBD será realizada a anastomose entre o ducto biliar dilatado e o duodeno de forma látero-lateral, e o ducto biliar aberto transversalmente, o duodeno, longitudinalmente, na extensão de 1 cm. Nos animais DBJ a anastomose será feita látero-terminal com a alça jejunal seccionada à cerca de 5 cm do ângulo duodenojejunal de Treitz. A anastomose jejuno-jejunal será realizada a 15 cm da hepaticojejunoanastomose. Todas as anastomoses são feitas em plano único com pontos contínuos de fio Vicryl 5-0.

Nos animais DBJ-DJ a anastomose biliodigestiva será feita látero-terminal com alça jejunal seccionada à cerca de 5 cm do ângulo duodenojejunal de Treitz. Será confeccionada

uma anastomose látero-lateral entre a alça jejunal exclusiva do Y de Roux e a primeira porção duodenal. A anastomose jejuno-jejunal será realizada a 15 cm da hepaticojejunoanastomose. Todas as anastomoses serão feitas em plano único com pontos contínuos de fio Vicryl 5-0. No momento das derivações biliodigestivas serão realizadas as biópsias hepáticas e as coletas de sangue para os estudos bioquímicos do sangue e após cerca de noventa dias, os animais serão submetidos aos mesmos estudos., além da avaliação refluxo enterogástrico (REB) e do trânsito gastrintestinal com Fitato  $^{99m}\text{Tc}$  e do fluxo hepatobiliointestinal com Disida  $^{99m}\text{Tc}$ .

A síntese da parede abdominal será realizada de modo idêntico em todos os animais, sendo o peritônio, a aponeurose e a pele fechados em bloco com chuleio contínuo de nylon monofilamentado 3.0. No pós - operatório, todos os animais são mantidos em gaiolas isoladas por 24 horas e alimentados com ração padrão e água ad libitum.

## BIOQUÍMICA DO SANGUE

### **Coleta do sangue:**

Dos animais serão colhidos aproximadamente 2.5 ml de sangue mediante a punção da veia caudal previamente aquecida com butterfly nº 26. O sangue é depositado em tubo de ensaio sem anticoagulante e após a retração do coágulo, o soro será separado para avaliação bioquímica. Para a reposição da perda sanguínea será infundido 6 ml de soro glicofisiológico a 5%.

### **Dosagens no soro:**

Birrubinas totais e frações: dosagem pelo método de SIMS e HORN (1958); Kits Analisa Diagnóstica (Analisa Diagnóstica Ltda., Belo Horizonte, MG).

Fosfatase Alcalina: dosagem pelo método de ROY (1970); Kits Analisa Diagnóstica (Analisa Diagnóstica Ltda., Belo Horizonte, MG).

Alanina aminotransferase (ALT) e Aspartato Aminotransferase (AST): dosagem pelo método de REITMAN E FRANKEL (1957); Kits Analisa Diagnóstica (Analisa Diagnóstica Ltda., Belo Horizonte, MG).

## ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO.

Os fragmentos de fígado serão fixados por imersão em líquido de Carnoy (60% de ácido acético glacial), por três horas e depois transferidos para uma solução de álcool a 70%. As transecções de tecido hepático de 5-µm serão coradas com Hematoxilina e Eosina e, Tricomico Masson e secções consecutivas serão avaliadas através de imunohistoquímica por meio de reação com anticorpo para desmina para evidenciar as células de Ito. Para a fixação

de antígeno os cortes histológicos serão pré-tratados com 10 mM em conservante de citrato de sódio (PH6.0) em estufa pressurizada por 3 minutos. A desmina será evidenciada com MoAb (IgG, Dako, Denmark), diluída 1:200 em conservante Tris por 2 horas e o anticorpo secundário será um anti-IgG (Dako, Denmark). A imunofixação será realizada utilizando-se o método Strept-ABC com diaminobenzidine-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como um cromógeno e contracorado com hematoxilina de Mayer. Secções de músculo estriado serão considerados os controles positivo, e os anticorpos primários serão omitidos nos controles negativos de secções hepáticas.

A análise morfométrica do fígado será realizada por um único examinador que não conhece o tratamento, mediante captura das imagens histológicas de fragmentos de biópsia hepática corados com Tricrômico de Masson. Utilizar-se-á um microscópio Axiophot Zeiss com uma câmera digital acoplada ao seu cabeçote superior e a um computador através de uma placa de captura de imagens Frame Grabber Zeiss. Desta forma, as imagens serão captadas pelo sistema no padrão RGB com 648x474 linhas para análise por meio do software gráfico KS400 V2.0 – Kontron Elektronik GmbH (FAZAN et al,1997). Em geral são identificadas três estruturas distintas: os hepatócitos representados por estruturas coradas em Vermelho (não puro), a fibrose representada por estruturas coradas em Azul (não puro) e ductos cuja coloração não permite identificação automática pelo sistema. Desta forma, será empregado um recurso denominado Limiar ou threshold que permite a análise do espectro dos três canais de cores RGB presentes na imagem. Na primeira análise da imagem, são marcadas as faixas nos três espectros que melhor representam o componente histológico em avaliação. Nesse processo, algumas outras estruturas são, ocasionalmente, contabilizadas em virtude da falta de pureza da coloração. Para corrigir tal viés, o examinador realiza um ajuste fino das faixas dos histogramas de cor de forma a eliminar estas estruturas indesejáveis como hemácias, por exemplo, que tem o espectro de cor vermelha, semelhante aos hepatócitos.

Terminada essa etapa inicia-se um processo automático para obter a área dos componentes selecionados, que consiste em:

- Calibração da imagem, por meio do conjunto objetiva x optovar, para conhecer a equivalência entre micrômetro e pixel (unidade básica de imagem) da imagem.
- Obtenção do valor da área mediante soma de pequenos polígonos, contabilizando uma área total da região selecionada.

Assim, tendo o valor da área total do quadro captado, e a área da região selecionada, pode-se calcular com precisão a porcentagem dos componentes histológicos selecionados presentes no fragmento analisado. Desta forma o processo ocorre para cada quadro captado do fragmento analisado, finalizando com os dados de área de cada estrutura desejada.

Foi definido, por meio de um estudo piloto prévio, que a análise de 30 campos com aumento de 256X representa uma amostra significativa de cada lâmina. Assim, faz-se a captura sistemática por meio do Frammer Óptico de, em média, 200 campos de cada lâmina que representam mais de 50% da área total de cada lâmina, e o computador seleciona, aleatoriamente, os 30 campos para a análise morfométrica.

A fração de volume, em porcentagem, é obtida diretamente pela representação proporcional da área dos elementos histológicos do fígado, hepatócitos, fibrose, ductos biliares e outros elementos histológicos. Adotando-se a equivalência entre a fração com o volume ocupado pelos diferentes componentes teciduais e a respectiva massa, obtém-se as frações absolutas estimadas de massa destes componentes, mediante produto da fração de volume pela massa total do fígado expressos em g/kg de peso corporal (.ZIMMERMANN, et al,1992).

A análise morfométrica das células estreladas hepáticas será realizada com mesmo equipamento descrito. Assim, por meio do auxílio do *frammer* óptico, seleciona-se aleatoriamente 30 campos em cada lâmina e com aumento, 400 vezes, faz-se de forma interativa e independente da análise do *software* KS 400, a contagem das CEH na zona metabólica hepática 1. Os resultados são expressos mediante soma do número de CEH em cada um dos 30 campos obtidos de cada lâmina.

## QUANTIFICAÇÃO DO REFLUXO ENTERO BILIAR E TRÂNSITO GASTRINTESTINAL

Reilly et al.(1990) e Arbós et al.(1992) estudaram o trânsito gastrintestinal, em ratos, por meio de método cintilográfico, que foi modificado em no nosso meio (DUTRA et al,2007) para a avaliação do refluxo enterobiliar (REB).

## APARELHAGEM

Para a determinação da dose do radiotraçador será utilizado um contador MICRO CURIE METER modelo XL 1011, PHILLIPS. Na quantificação do REB será utilizada uma câmara de Cintilação SIEMENS ORBITER COM COLIMADOR LEAP, Modelo DIGITRAC 75, Illinois, USA, para contagem da radiação, no modo estático.

## RADIOTRAÇADOR

A dose de 3,7 MBq de tecnécio(<sup>99m</sup>Tc) será combinada com 20 mg de FITATO DE SÓDIO e 2 mg de cloreto estanhoso em forma liofilizada, sob alto vácuo (FITATO <sup>99m</sup>Tc - IPEN, São Paulo) para ser empregada em cada animal.

## TÉCNICA

O teste será realizado, em média, após noventa dias de pós-operatório nos animais tratados. Serão separados e mantidos sem ração nas vinte e quatro horas anteriores e sem ração e líquidos nas doze horas que precederam ao estudo. Serão pesados e imobilizados manualmente para a introdução de um cateter maleável nº 6 pela boca a ser posicionado no estômago. Pelo cateter será administrado o radioisótopo diluído em 2 ml de solução de cloreto de sódio a 0,9%, com os animais acordados. A seguir, a sonda será retirada. Adotamos um tempo padronizado de 10 minutos entre cada animal, tempo este necessário para o isolamento das peças cirúrgicas. Quando faltar 30 segundos para completar o tempo de prova, que foram padronizados em 15 minutos e 4 horas, os animais serão rapidamente anestesiados com Tiopental sódico. Ao se completar o tempo, realizamos a laparotomia sendo então obtidos os segmentos viscerais por meio de dissecação e amarras com fios de algodão 4.0. Para impedir a progressão do radioisótopo com a manipulação das vísceras, as amarras do jejuno e do duodeno próximos à anastomose com a via biliar são realizadas como primeiro tempo cirúrgico.

Peça nº1: Fígado e via biliar: Ligadura do segmento intestinal logo abaixo da anastomose biliojejunal. Na anastomose bilioduodenal, ligadura proximal e distal a mesma. A seguir, ligadura e secção dos vasos e dos ligamentos do fígado.

Peça nº 2: Estômago

Peça nº 3: Intestino delgado

Peça nº 4: Intestino grosso.

Peça nº 5: Y de Roux (subgrupo com anastomose biliojejunal).

As vísceras são acondicionadas em dedos de luvas, individualmente, sendo devidamente identificadas, para, a seguir, serem submetidas à contagem da radiatividade. Na seqüência, os animais serão sacrificados.

Em cada peça, é quantificada a emissão gama emitida (“Kilocount”/minuto). Do valor obtido é subtraída a radiatividade de fundo (BG). As somas dos valores correspondentes às leituras das peças serão consideradas como 100%. A radiatividade emitida pelo fígado e via

biliar, estômago e segmentos intestinais são expressos em porcentagem deste total.

## QUANTIFICAÇÃO DA FUNÇÃO HEPÁTICA E DA PERMEABILIDADE DA VIA BILIAR COM $^{99m}\text{Tc}$ DISIDA

Com a utilização do  $^{99m}\text{Tc}$  DISIDA pode-se avaliar a função do hepatócito, a excreção para a via biliar e a presença deste radiotraçador no intestino delgado (BALON et al., 1997).

## APARELHAGEM

Para a determinação da dose do radiotraçador é utilizado um contador MICRO CURIE METER modelo XL 1011, PHILLIPS. No estudo da função hepática e da permeabilidade hepatobiliointestinal é utilizada uma câmara de Cintilação SOPHA DST COLIMADOR LEAP, Illinois, USA, em modo dinâmico, para contagem da radiação.

## RADIOTRAÇADOR

O isótopo empregado é o Tecnécio ( $^{99m}\text{Tc}$ ) obtido a partir de um gerador de Molibdênio fornecido pelo Instituto de Pesquisa em Energia Nuclear (IPEN- São Paulo). A dose de 37 MBq do radioisótopo é combinada com 10mg de DISIDA (N alfa 2,6 diisopropil acetanilina do ácido iminodiacético) e 0,3 mg de cloreto estanhoso bihidratado, em forma liofilizada, sob alto vácuo (DISIDA  $^{99m}\text{Tc}$  -IPEN –São Paulo).

## TÉCNICA

Baseada na descrita por Smith et al. (1978) que estudaram a farmacocinética de diferentes radiofármacos em estudos de cintilografia hepatobiliar em ratos.

Os exames são realizados, em média, após noventa dias de pós-operatório nos animais tratados. São separados e mantidos sem ração nas vinte e quatro horas anteriores e sem ração e líquidos nas doze horas que precederem o estudo. Serão pesados e anestesiados com Tiopental intraperitoneal e submetidos à dissecação da veia jugular interna com o posicionamento de um cateter fino (cateter umbilical 3,6 Fr x 41cm Becton-Dickinson), pelo qual será injetado o radiotraçador. Imediatamente, será iniciado o estudo dinâmico, com fase de fluxo sanguíneo, durante 1 minuto (a cada 2 segundos) e fase funcional, durante 30 minutos (a cada 15 segundos) com áreas de interesse (ROI) no coração, fígado, vias biliares e no intestino delgado. Será avaliado o tempo de atividade hepática máxima obtidas através da curva tempo/atividade do radiotraçador no fígado (Tmax), e tempo de excreção da metade do radiofármaco injetado pelo parênquima hepático (T  $\frac{1}{2}$ ), sendo excluídas as áreas de atividade

intestinal. O tempo de surgimento da bile radiativa no intestino delgado, será interpretado por dois pesquisadores diferentes, que não conhecem os grupos, utilizando-se imagens estáticas. A seguir os animais serão submetidos à coleta de sangue para análise bioquímica e a laparotomia para biópsia hepática.

## **BIBLIOGRAFIA**

ADBEL AZIZ G, LEBEN G, RESCAN PY et al. Reversibility of hepatic fibrosis in experimentally induced cholestasis in the rat. *Am J Pathol*, 137: 1333-42, 1990.

AFROUDAKIS A, KAPLOWITZ N. Liver histopathology in chronic common bile duct stenosis due to chronic alcoholic pancreatitis. *Hepatology*, 1: 65-72, 1981.

ARBÓS J; ZEGRI A; LÓPEZ SORIANO, FJ; ARGILÉS JM. A simple method for determining the rate of gastrointestinal transit in the rat. *Archives Inter. Physiologie de Biochimie et de Biophysique*.v. 101, p. 113-115, 1993.

ARONSON DC, CHAMULEAU RAFM, FREDERIKS WM, GROOSZEN HG, HEIJMAS HSA, JAMES J. Reversibility of cholestatic changes following experimental common bile duct obstruction: Fact or fantasy? *J Hepatol*, 18: 85-95, 1993.

BALON HR.; FINK-BENNET DM; BRILL BR.; FIG LM.; FREITAS JE.; KRISHNAMURTHY GT.; KLINGENSMITH III WC.; ROYAL HD. Procedure guidelines for hepatobiliary scintigraphy. *J Nuclear Med*. v.38 ,p.1654-1657,v.10,1997.

BESSON A. The Roux-Y loop in modern digestive tract surgery. *Am.J.Surg.*, v.149 ,p. 656-664, 1985.

CASTRO & SILVA jr., O ; MAZZETO,SA ;SANTOS, JS.; CENEVIVA, R.; ZUCOLOTO,S. Experimental induction of secondary biliary cirrhosis in rats. A new surgical procedure. *Res. Surg.* ,v.7, p. 42-44,1995.

CHUANG LH; LEE S Y ; CHEN WJ, HSIEH CS, CHANG NK, LO SK. Changes in bacterial concentration in liver correlate with that in the hepaticojejunostomy after bile duct reconstruction: Implication in the pathogenesis of postoperative cholangitis. *World J. Surg.* v.25, p.1512-1518,2001.

DUTRA R A, SANTOS JS, ARAÚJO WM, SIMÕES V, BECKER ANPP, SERAFIM, LN Evaluation of hepatobiliary excretion and enterobiliary reflux in rats with biliary



obstruction submitted to bilioduodenal or biliojejunal anastomosis. *Dig Dis and Science*, 2007, no prelo.

ESCUDERO – FABRE A., ESCALLON JR A., SACK J., HALPERN NB., ALDREE JS. Choledochoduodenostomy. analysis of 71 cases followed for 5 to 15 years, *Ann. Surg.*, v. 213, p.635-644, 1991.

FAZAN VPS, SALGADO HC, BARREIRA AA. Descriptive and quantitative light and electron microscopy study of the aortic depressor nerve in normotensive rats. *Hypertension*; 30: 693-8, 1997.

FRIEDMAN SL. The cellular basis of hepatic fibrosis: mechanisms and treatment strategies. *N Engl J Med*, 328: 1828-35, 1993.

GROSS JB, REICHEN J, ZELTNER T, ZIMMERMANN A. The evolution of changes in quantitative liver function tests in rat model of cirrhosis. *Hepatology* 7:457-63,1987.

HAMMEL P, COUVELARD A, O'TOOLE D, RATOUIS A, SAUVANET A, FLEJOU JF, DEGOTT C, BELGHITI J, BERNADES P, VALLA D, RUSZNIEWSKI P, LEVY P. Regression of liver fibrosis after biliary drainage in patients with chronic pancreatitis and stenosis of the common bile duct. *New Eng J Med*, 344(6): 418-23, 2001

HASHIMOTO, NAOKI ; OHYANAGI , HARUMASA. Hepatobiliary Scintigraphy after Biliary Reconstruction-A Comparative Study on Roux-Y and ESCD. *Hepatogastroenterology*, v.47, p.1210-1212,2000.

HASHIMOTO,N; KOTOURA, Y; OHYANAG, H. Hepatobiliary scintigraphy after biliary reconstruction Roux Y and RY-DJ. *Hepatogastroenterology*, v.52, p. 200-202, 2005.

KLAUS A.,WEISS H.,KRECZY A., EIGENTLER A., NEHER C., MARGREITER R.,PERNTHALER H.A new biliodigestive anastomosis technique to prevent reflux and stasis.*The American Journal of Surgery*. v.182.p. 52-57, 2001.

KONTOURAS J, BILLING BH, SCHEUER PJ. Prolonged bile duct obstruction: A new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br J Exp Pathol*, 65:305-11,1984.

KRAHENBUHL L, SHAFER M, KRAHENBUHL S. Reversibility of hepatic mitochondrial damage in rats with long term cholestasis. *Journal of Hepatology* .v.28,p.100-1007,1998.

LESUR G, LEVY P, FLEJOU JF, BELGHITI J, FEKETE F, BERNADES P. Factors predictive of liver histopathological appearance in chronic alcoholic pancreatitis with common bile duct stenosis and increased serum alkaline phosphatase. *Hepatology*, 18: 1078-81, 1993.

MATTHEWS JB, BAER HU, SCHWEIZER WP. Recurrent cholangitis with and without anastomotic stricture after biliary-enteric bypass. *Arch Surg*, 128: 269-72, 1993.

PANDOLFI JR.,H., SANTOS,JS., ZUCOLOTO,S., RAMALHO,LNZ., CASTRO E S ILVA JR.; CENEVIVA,R. A evolução da fibrose biliar secundária em ratos tratados mediante derivação bilioduodenal e biliojejunal com alça de Roux medindo 5,10 e 15 cm. *Acta Cirúrgica Brasileira* .v.16, suplement.1,p.47-51,2001.

PANIS Y; FAGNIEZ PL; BRISSET D. Long term results of choledochoduodenostomy versus choledochojejunostomy for choledocholithiasis. *Surgery Gynecology and Obstetrics*, 177: 33-37,1993.

PLAISIER,PW; VAN DER HUL,RL; LAMERIS,JS; OEI, HY; TERPSTRA ,OT. Routine testing of liver function after biliary enteric anastomosis has no clinical relevance. *Hepatogastroenterology*, v.48, p. 622-624, 2001.

REILLY , JA ; FORST, MA ; QUIGLEY, EEM; RIKKERS, LF. Gastric emptying of liquids and solids in the portal hypertensive rat. *Dig. Dis.Sci.*, v.35(6), p 781-786, 1990.

REITMAN,S ;FRANKEL,S. A calorimetric method for the determining of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin.Pathol.*, v.28, p.56-63, 1957.

SANTOS,JS, CENEVIVA R, CASTRO E SILVA O JR, SALGADO JR W, GARCIA AMC.

Evolução da cirrose biliar secundária após derivação bilioduodenal em ratos. Acta Cir.Bras., suplement.1, p.45-48, 1996.

SANTOS, JS.; CENEVIVA, R.; CASTRO E SILVA JR., O.; ZUCOLOTO, S.; CABRERA, AM. Evolution of secondary bile cirrhosis by comparing the effects of bilioduodenal and biliojejunal shunts. Digestion. v.59, p.554,1998.

SANTOS, JS; JUNIOR, WS; MODENA, JL; BRUNALDI, JE; CENEVIVA,R.Effect of preoperative endoscopic decompression on malignant biliary obstruction and postoperative infection. Hepatogastroenterology, v.52(61), p. 45-47, 2005.

SIMS, FH; HORN,C.Some observation on powell's method for the determination of serum bilirubin. Am.J. Clin.Pathol.,v. 29, p. 412-417,1958.

SMITH, RB; COUPAL, J; DELAND, FH; TRIPLETT,JW.Pharmacokinetics of Hepatobiliary imaging agents in rats: concise communication.The Journal of Nuclear Medicine.v.20, n.1,p.45-49.1978.

STEFANINI P., CARBONI M., PATRASSI N., BASOLI A., BERNARDINIS G., NEGRO P.Roux em Y hepaticojejunosotomy:a reappraisal of its indications and results. Ann. Surg. p. 2113-219, february, 1975

TOYOTA N, MIYAI K, HARDISON WGM. Effect of biliary pressure versus high bile acid flux on permeability of hepatocellular tight junction. Lab.Invest., v.50, p.536-542, 1984.

UCHIYAMA K, ONISHI H, TANI M, KINOSHITA H, KAWAI M, UENO M, YAMAUE H. Long-term prognosis after treatment of patients with choledocholithiasis. Ann Surg, 238: 97-102, 2003.

Van TRAPPEN G, JANSSENS J, HELLEMANS. The interdigestive motor complex of normal subjects and patients with bacterial overgrowth of small intestine.J. Clin.Invest., v. 59, p. 1158-1166, 1977.

YEONG ML, NICHOLSON GI, LEE SP. Regression of biliary cirrhosis following

choledochal cyst drainage. *Gastroenterology*, 82: 332-5, 1982

ZIMMERMANN H, REICHEN J, ZIMMERMANN A, SAGESSER H, THENISCH B, HOFLIN F. Reversibility of secondary biliary fibrosis by biliodigestive anastomosis in the rat. *Gastroenterology*, v. 103, p. 579-89, 1992.

ZIMMERMANN H, FELLAY M, ZIMMERMANN A. Hepatic stellate cells (Ito cells) but not collagen IV may partly be responsible for lower portal pressure after reversing secondary biliary cirrhosis in the rat. *J Hepatol*, 26: 158-66, 1997.

PROCOLO Nº

PROCOLO PARA USO DE ANIMAIS EM EXPERIMENTAÇÃO

1. Finalidade: ( ) Ensino ( x ) Pesquisa Data Início: \_\_ / \_\_ / \_\_ Término: \_\_ / \_\_ / \_\_

2. Nome do Docente Responsável: José Sebastião dos Santos  
Departamento: Cirurgia e anatomia Ramal: 2508  
e-mail: jsdsanto@fmrp.usp.br

3. Colaboradores: 1) Robson Azevedo Dutra  
2)  
3)  
4)

4. Título do Projeto ou Aula Prática:

Avaliação das lesões hepáticas, da excreção hepatobiliar e do refluxo enterobiliar em ratos com obstrução biliar, submetidos às derivações bilioduodenal, biliojejunal em Y de Roux e biliojejunal com decompressão duodenal da alça jejunal exclusiva.

Título do Projeto ou Aula Prática, em inglês:

Evaluation of the of liver injuries, hepatobiliary excretion and enterobiliary reflux in rats with biliary obstruction submitted to bilioduodenal, biliojejunal and biliojejunal anastomosis with decompression of excluded jejunal limb.

5. Informações sobre o MODELO ANIMAL:

5.1 Procedência:

- ( x ) Biotério de criação  
Especificar o biotério de criação: biotério central da faculdade de medicina de ribeirão preto  
( ) Animal silvestre (anexar autorização para uso fornecida pelo IBAMA)

5.2 Descrição da espécie:

Camundongo ( )	Rato ( X )	Cobaia ( )
Hamster ( )	Coelho ( )	Cão ( )
Gerbil ( )	Outro ( )	

Linhagem (ns):Wistar  
Sexo: M ( x ) F ( )  
Idade e/ou Peso: 250 a 350 g

5.3 Existe planejamento estatístico para determinar o tamanho da(s) amostra(s)?

Sim ( x ) Não ( )

Se não, justifique: Planejamento estatístico já adotado para a linha de pesquisa em questão, e utilizado em teses de mestrado e doutorado elaboradas pelo programa de Pós – Graduação da USP de Ribeirão Preto.

“ Avaliação da excreção hepatobiliar e do refluxo enterobiliar em ratos submetidos às derivações bilioduodenal e biliojejunal. Estudo experimental em ratos” Aluno : Robson Azevedo Dutra.  
Orientador: Prof. Dr. José Sebastião dos Santos.

“Evolução da fibrose biliar secundária em ratos tratados mediante derivações bílio-duodenal ou bílio-jejunal com alça de Roux medindo 5, 10, 15 cm” Aluno: Harley Pandolfi Junior.  
Orientador : Prof. Dr. José Sebastião dos Santos.

