

VALENTIN BACCARIN

ESTUDO DA ULTRA-ESTRUTURA HEPÁTICA EM CIRURGIA
CARDÍACA COM TÉCNICAS DE HIPOTERMIA PROFUNDA
GERAL
(ESTUDO EXPERIMENTAL EM CÃES)

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas
- UNICAMP-

-1991-

13580

B12e

13580/BC

Í N D I C E

	Pág.
I. INTRODUÇÃO	02
II. MATERIAL E MÉTODO	14
II.1. MATERIAL	14
II.1.1. ANIMAL DE EXPERIÊNCIA	14
II.2. MÉTODO	16
II.2.1. CIRURGIA	17
II.2.1.1. PRÉ-OPERATÓRIO	17
II.2.1.2. ANESTESIA	17
II.2.1.3. INDUÇÃO DA ANESTESIA	17
II.2.1.4. VENTILAÇÃO PULMONAR	18
II.2.1.5. PREPARO DO ANIMAL DE EXPERIÊN- CIA	18
II.2.1.6. MANUTENÇÃO DA ANESTESIA	20
II.2.1.7. VIA DE ACESSO	21
II.2.1.8. BIÓPSIAS DO FÍGADO	21
II.2.1.9. CIRCULAÇÃO EXTRACORPÓREA	22
II.2.1.10. CONJUNTO CORAÇÃO-PULMÃO ARTIFI- CIAL	25
II.2.1.11. PERFUSATO	26
II.2.1.12. CARDIOPLEGIA	26
II.2.1.13. TÉCNICA DE HIPOTERMIA PROFUNDA GERAL DE INDUÇÃO EXTERNA E IN- TERNA COM PARADA CIRCULATÓRIA TOTAL POR PERÍODO DE 50 MINU- TOS (GRUPO I)	27

II.2.1.14.	TÉCNICA DE HIPOTERMIA PROFUNDA GERAL DE INDUÇÃO EXTERNA E IN- TERNA COM PERÍODO DE BAIXO FLU- XO SANGUÍNEO (0,5 l/min./m ²) SISTÊMICO DE 50 MINUTOS (GRUPO II).....	32
II.2.1.15.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA	35
II.2.1.15.1.	EQUIPAMENTO	35
II.2.1.15.2.	TÉCNICA UTILIZADA.	36
	A. FIXAÇÃO	36
	B. PÓS-FIXAÇÃO	36
	C. IMPREGNAÇÃO POR SAL DE URÂNIO	37
	D. DESIDRATAÇÃO	37
	E. INFILTRAÇÃO E INCLUSÃO ..	37
	F. MICROTOMIA	38
	G. IMPREGNAÇÃO POR CHUMBO ..	38
	H. MICROSCOPIA	38
	I. ELETROMICROGRAFIAS	39
III.	RESULTADOS	40
IV.	DISCUSSÃO	68
V.	CONCLUSÕES	77
VI.	RESUMO	78
VII.	SUMMARY	79
VIII.	BIBLIOGRAFIA	80

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Luiz Sergio Leonardi, que iniciou-me no aprendizado e no desenvolvimento da cirurgia e que muito contribuiu com sua opinião e estímulo, na confecção desta tese.

Ao Professor Doutor Reinaldo Wilson Vieira, que foi o orientador deste trabalho e que com seu apôio e seu incentivo constantes influenciou decisivamente na minha vida profissional e acadêmica tornando possível a elaboração desta tese.

Ao Doutor Aureo Tatsumi Yamada, do Instituto de Biologia da UNICAMP, que com dedicação extremada, auxiliou-me com inestimável valor nos estudos de microscopia eletrônica.

Ao Professor Doutor Norair Salviano dos Reis, do Instituto de Biologia da UNICAMP, pela colaboração nos estudos de microscopia eletrônica.

Pela valiosa cooperação, meus agradecimentos especiais à Antonia Maria Ferreira Lima, Maria Tereza de Paula, Adriane Cristina Sarti Spogis e João Roberto Malheiros Bauer, funcionários do Centro de Microscopia Eletrônica do Departamento de Histologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Aos funcionários do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, Gomes Sarmiento Alvim e Willian Adalberto Silva, pela dedicação ao cuidar dos animais de experiência.

ESTUDO DA ULTRA-ESTRUTURA HEPÁTICA EM CIRURGIA CARDÍACA COM TÉCNICAS DE HIPOTERMIA PROFUNDA GERAL.

(ESTUDO EXPERIMENTAL EM CÃES)

I. INTRODUÇÃO:

A hipotermia é o estado no qual a temperatura corpórea é mais baixa que o considerado normal, para os seres homeotérmicos.

A finalidade da utilização da hipotermia na cirurgia cardíaca é, através do esfriamento dos tecidos, reduzir a atividade metabólica, diminuindo com isso a necessidade de oxigênio do organismo, permitindo a diminuição do fluxo sanguíneo sistêmico na utilização da circulação extracorpórea ou quando do emprêgo da parada circulatória total, permitindo um período de tempo superior ao que seria possível em estado de normotermia.

Existem, entretanto, diferenças fisiológicas entre os graus de hipotermia, que podem ser classificados, segundo MOHRI & MERENDINO (1971) em: ligeira (35o a 28oC); moderada (27o a 21oC); profunda (20o a 15oC) e profundíssima (abaixo de 15oC).

Autores trabalhando na área experimental, tem estudado os efeitos do frio sobre o organismo animal homeotermo e sobre o organismo humano.

SMITH & SAND (1940) foram os primeiros a aplicar seus conhecimentos de hipotermia no tratamento dos pacientes. Através dos experimentos em crescimento de células embrionárias, observaram que a hipotermia reduz o metabolismo das células "in vitro".

Essas investigações estimularam outros autores a examinarem os efeitos da hipotermia em animais de laboratório DILL & FORHER (1941), FUHRMAN e CRISMON (1948), ALTMANN (1949) e BIGELOW e col. (1950).

BIGELOW e col. (1950) demonstraram experimentalmente, em cães, a possibilidade de realização da cirurgia cardíaca com parada circulatória total de 15 minutos sob hipotermia geral (25° e 20°C) de indução externa. Este trabalho estimulou os cirurgiões a investigararem a fisiologia da hipotermia e suas aplicações clínicas difundindo assim o seu uso (GOLLAN, 1959).

Na mesma década BOEREMA e col. (1951) e DELORME (1952) realizaram experimentos com hipotermia de indução interna, desviando sangue da artéria femoral para a veia safena

magna, passando por um tubo em espiral imerso em recipiente contendo água fria. O fluxo sanguíneo dentro do permutador dependia exclusivamente do débito cardíaco do animal de experimentação.

A técnica de utilização da hipotermia profunda geral de indução interna foi preconizada por GOLLAN (1959) após o desenvolvimento dos sistemas de circulação extracorpórea.

O emprego da circulação extracorpórea com hipotermia profunda ou moderada foi usado clinicamente por SEALY e col (1958), DUBOST e col (1960).

A frequência de ocorrência de fibrilação ventricular à temperaturas ao redor de 28°C limitou o uso clínico da hipotermia profunda geral de indução externa; e as complicações decorrentes da circulação extracorpórea (hipotermia profunda geral de indução interna) com mortalidade excessivamente alta em crianças, limitaram o seu uso, e a hipotermia profunda geral foi gradualmente abandonada.

Em 1966, a hipotermia profunda geral de indução externa voltou a ser praticada sem risco de fibrilação ventricular por MOHRI e col. (1966) e DILLARD e col. (1967).

Técnicas de hipotermia profunda geral de indução externa associada a indução interna (circulação extracorpórea), com parada circulatória total ou período de baixo fluxo

sanguíneo sistêmico foram introduzidas por BARRAT-BOYES e col., (1971) e KIRKLIN e col. (1973) respectivamente.

Procedimentos outros, nas técnicas de hipotermia profunda geral foram introduzidos em diferentes serviços de cirurgia cardíaca (RITTENHOUSE e col. 1974).

Uma das complicações no pós operatório de cirurgias cardíacas realizadas com auxílio da circulação extracorpórea, em condições de normotermia ou hipotermia nos seus diferentes graus, é a icterícia pós circulação extracorpórea, que ocorre por alteração da conjugação e excreção das bilirrubinas pelo fígado submetido às essas técnicas COLLINS e col. (1983).

TALBOT e col. (1941) descrevem um caso clínico, no qual o paciente havia sido submetido à redução da temperatura com fins terapêuticos, falecendo durante o processo e creditam o óbito ao resultado de alterações hepáticas funcionais e não a alterações de ordem anatômica.

SARAJAS e col. (1954) descreveram alterações degenerativas na porção central dos lóbulos hepáticos em cães submetidos à hipotermia profunda.

BERNHARD e col. (1955) examinaram fígados de cães, submetidos à oclusão da artéria hepática durante a hipotermia, por meio de biópsias feitas com auxílio de agulha, e obser-

varam edema sem alterações da arquitetura hepática. Estudos subsequentes não foram suficientes para demonstrar alterações do glicogênio hepático após o emprego da hipotermia.

Experimentalmente, KNOCKER e col. (1955) observaram depleção do glicogênio hepático e aumento da deposição de lípidos no fígado acrescentando que os sinusóides apresentavam-se dilatados e congestos, atribuindo essas alterações à anóxia.

FALKMER & KJELLGREN (1955) e DUNLOP e col. (1962), relataram o caráter reversível dessas alterações que foram atribuídas à hipotermia e à hipóxia.

FISCHER e col. (1957) demonstraram alterações de depósito de lípidos e diminuição do glicogênio hepático e responsabilizaram a anóxia mais do que a hipotermia como fator desencadeante.

Utilizando modelo experimental próprio, ANDERSEN e col. (1957) mostraram alterações funcionais durante circulação extracorpórea com baixo fluxo, resultantes da diminuição do fluxo sanguíneo hepático.

Experimentalmente, em cães, utilizando hipotermia profundíssima de indução interna (10°C) durante 30 minutos com parada circulatória total, TREDE e col. (1961) referem discretas alterações congestivas em dois cães.

Trabalho experimental realizado por KHEDROD e col. (1964) utilizando circulação extracorpórea e normotermia em cães, mostraram a nível de microscopia optica, redução do glicogênio intracelular, não apresentando alteração quantitativa ou qualitativa em relação à estrutura hepática.

Em 736 cirurgias realizadas em "ANIMA NOBILIS", SANDERSON e col. (1966) encontraram 63 casos de icterícia pós cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea e hipotermia moderada. No grupo com icterícia precoce a causa descrita foi a colestase intra-hepática, e no grupo com icterícia tardia, onde ocorreram dois óbitos, o achado anátomo-patológico foi necrose centrolobular. Atribuíram ao estado de choque e à ação de substâncias vasoativas no fluxo sanguíneo hepático, como responsáveis pela lesão.

KINGSLEY (1966) em 19 pacientes submetidos à cirurgia cardíaca sob hipotermia profunda geral de indução interna, usando a técnica de DREW com a modificação de HURT, com períodos de parada cardíaca variando de 27 a 71 minutos, apresentou dez casos com icterícia clínica. Nos três óbitos da série, o achado anátomo-patológico revelou necrose centrolobular. Esse autor responsabiliza a idade dos pacientes como fator contribuinte, assim como o grau de insuficiência cardíaca direita.

Outros autores como LOCKEY e col. (1967) demonstraram usando circulação extracorpórea e normotermia, 13% de incidência de icterícia pós cirurgia cardíaca. Os achados anátomo-patológicos mostraram apenas congestão centrolobular com colestase intra-hepática. Esse quadro seria conseqüente à disfunção hepática prévia e a hemólise provocada pela circulação extracorpórea além da insuficiência cardíaca. O tipo de patologia apresentada pelo paciente também é importante, sendo mais frequente nas lesões mitrais que aórticas. Concomitantemente ROBINSON e col. (1967) usando hipotermia moderada e circulação extracorpórea confirmaram através de dosagens enzimáticas que há lesão hepática e correlacionam essas alterações à idade do paciente, gravidade da lesão prévia, (sendo mais comum em mitrais) e ao tempo de perfusão. A anóxia hepática seria a causa básica. A necrose centrolobular foi o achado anátomo-patológico comum nos óbitos ocorridos.

Icterícia pós cirurgia cardíaca com uso de circulação extracorpórea algumas vezes pode ser fatal como refere GAUTAM (1969) em uma paciente de 17 anos submetida à correção total de tetralogia de Fallot, onde houve um bloqueio das veias hepáticas conseqüente ao diâmetro avantajado da cânula da veia cava inferior, levando à necrose hepática. O achado anátomo-patológico mostrou necrose centrolobular, congestão da veia central e dos sinusóides adjacentes.

Alguns autores como MUNDTH e col. (1967) descrevem a insuficiência hepática progressiva após a cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea e hipotermia moderada. Lesões prévias como a hipertensão pulmonar ou insuficiência ventricular bilateral, levaram a um baixo débito cardíaco no período pós-operatório o que provocaria lesões por mecanismo de hipóxia tecidual. O exame histológico revela congestão centrolobular e estase biliar centrolobular. A contribuição da hemólise, acidose, congestão hepática e circulação extracorpórea seria pouco significativa.

Em nosso meio, PEREIRA e col. (1972) mostraram em 23 pacientes estudados, uma incidência de 30,4% de icterícias que se seguiram à cirurgia cardíaca com uso de circulação extracorpórea. Os achados anátomo-patológicos revelam apenas congestão hepática. A causa apresentada pelos autores seria a sobrecarga do coração direito que levaria à estase venosa e congestão dos sinusóides. Segundo esses autores a circulação extracorpórea prolongada levaria à hemólise e ao excesso de bilirrubina indireta acarretando prejuízo na conjugação e excreção da bilirrubina conjugada. LARMI e col. (1973), OLSON e col. (1984) e BOHMER e col. (1987), relatam a incidência da icterícia que ocorre no pós-operatório de cirurgia cardíaca, mostrando que o papel da hipotermia não é claro. O tempo de perfusão desempenharia papel importante.

Submetendo 102 pacientes à cirurgia cardíaca para troca de valvas cardíacas sob hipotermia moderada, SINGH e BAKER (1974) mostram correlação da icterícia que surge no período pós-operatório com o tempo de perfusão, tempo de isquemia do miocárdio e a idade do paciente.

O trabalho de COLLINS e col. (1983) mostrou uma incidência de 20% de icterícia pós-circulação extracorpórea em 248 pacientes estudados. A alta mortalidade nesse grupo de pacientes é digno de nota, chegando a 25%. Os autores afirmam que fatores como hipóxia, hipotensão, hipotermia, hemólise e insuficiência cardíaca prévia não estão associados à icterícia pós-extracorpórea. A morbidade e a mortalidade estão relacionadas com trocas valvares múltiplas, principalmente envolvendo a válvula tricúspide, necessidade de grandes transfusões e tempo de perfusão prolongado.

O estudo experimental feito em cães por LARMI (1973) com normotermia e hipotermia moderada, demonstra através de estudo enzimático graus de disfunção refratária, pós cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea. Responsabiliza a hipóxia, hipotermia, hemodiluição e hemólise, como causas para essas alterações. Em um estudo subsequente, referindo-se à função hepática após três horas de perfusão, em 20 cães submetidos à cirurgia cardíaca com hipotermia moderada e normotermia, refere apenas evidências indiretas atribuídas à hipóxia nas alterações da função hepática pós circulação extracorpórea.

Em publicação posterior LARMI (1973) refere que a circulação extracorpórea por si pode provocar icterícia precoce; quanto mais prolongada a perfusão maior a probabilidade de icterícia.

BIERNAT e col. (1974) relata que a hemodiluição, com alterações da pressão oncótica e osmolaridade sanguínea, diminuindo a quantidade de eritrócitos por milímetro cúbico, leva à hipóxia e consequentes lesão do fígado.

Em nosso meio OLIVEIRA e col. (1985) experimentalmente em cães, estudaram o comportamento da circulação hepática, com utilização de hipotermia moderada de indução interna, demonstrando aumento do fluxo sanguíneo na veia porta e artérias hepáticas.

Experimentalmente, BACCARIN (1986) demonstra a ausência de alterações da ultra-estrutura do parênquima hepático em cães submetidos à hipotermia profunda geral de indução interna e externa com período de baixo fluxo sanguíneo ($0,5 \text{ l/m/m}^2$ de superfície corpórea) sistêmico, de 50 minutos e hemodiluição total.

ESCALDA e col. (1985) e ESCALDA e col. (1988), através de micro-angiografia do fígado de cães submetidos à hipotermia, demonstra que o contraste injetado na veia porta não

perfunde adequadamente a estrutura sinusoidal, provavelmente conseqüente à contração dos esfíncteres pré e pós capilares.

LAGUDIS e col. (1990) em material humano conclue que a icterícia reflete defeito do polo excretor do hepatócito com a ausência de obstrução de vias biliares.

Embora o número de fatores etiológicos sugeridos na literatura seja grande, o mecanismo exato da lesão hepática permanece obscuro e pobremente entendido (LAMONT & ISSELBACHER, 1985).

Estes estudos se revestem de particular importância no que se concerne ao esclarecimento das alterações que possam ocorrer a nível de ultra-estrutura hepática, onde a visualização dos ductos e canaliculos biliares, assim como dos sinusóides hepáticos permitem fornecer subsídios para averiguações quanto à estase biliar e congestão dos sinusóides. A morfologia das mitocôndrias com seu arranjo em forma de lamelas, fornece informação à respeito do grau de hipóxia que possa ter ocorrido em consequência a uma perfusão tecidual não satisfatória, ou alterações conseqüentes à hipotermia profunda bem como da circulação extracorpórea.

Do exposto, o presente trabalho tem como objetivo, o estudo experimental, em cães, à microscopia eletrôni-

ca, das estruturas do parênquima hepático, observadas em biópsias periféricas retiradas do lobo esquerdo do fígado, utilizando as técnicas de hipotermia profunda geral de indução externa e interna em sequência à diferentes níveis de temperatura; com período de parada circulatória total por período de 50 minutos e com período de baixo fluxo ($0,5 \text{ l/min/m}^2$ de superfície corpórea) sanguíneo sistêmico, de 50 minutos, utilizando-se bomba de roletes, oxigenador de bolhas e hemodiluição total.

II. MATERIAL E MÉTODO

II.1. MATERIAL

II.1.1. ANIMAL DE EXPERIÊNCIA

Foram utilizados 12 cães mestiços, aparentemente sadios, fornecidos pelo Biotério do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, sendo as intervenções cirúrgicas realizadas no Laboratório de Técnica Operatória e Cirurgia Experimental do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP.

O peso dos animais variou entre 13 e 15 Kg com um valor médio de $13,810 \pm 0,530$ Kg (tabela I).

A superfície corpórea dos animais variou entre $0,63$ e $0,71$ m² com valor médio de $0,67 \pm 0,02$ m² (tabela I).

TABELA I

LIMITES EXTREMOS E VALORES MÉDIOS DO PESO E DA SUPERFÍCIE CORPÓREA.

PESO CORPÓREO (Kg)		SUPERFÍCIE CORPÓREA (m ²)	
LIMITES EXTREMOS	VALOR MÉDIO	LIMITES EXTREMOS	VALOR MÉDIO
13,00-15,00	13,810 ± 0,530	0,63 - 0,71	0,67 ± 0,02

II.2. MÉTODO

Com o objetivo de avaliar as possíveis alterações, em nível de ultra-estrutura dos componentes do parênquima hepático provocadas por técnicas diferentes de hipotermia profunda geral, dividimos os animais de experiência em dois grupos:

GRUPO I - Hipotermia profunda geral de indução externa e interna com parada circulatória total por período de 50 minutos (seis cães).

GRUPO II - Hipotermia profunda geral de indução externa e interna com período de baixo fluxo sanguíneo ($0,5 \text{ l/min./m}^2$) sistêmico de 50 minutos (seis cães).

Foram realizadas biópsias do lobo esquerdo do fígado. As biópsias foram retiradas na fase de esfriamento, nas temperaturas esofágicas de 37°C , 28°C , 20°C , 20°C ; após período de parada circulatória total ou de baixo fluxo sanguíneo sistêmico de 50 minutos e início de aquecimento, e a seguir nas temperaturas crescentes de 28°C e 37°C .

O controle da ultra-estrutura hepática em cada cão, foi realizada antes da indução da hipotermia profunda geral pela retirada de um fragmento de fígado à temperatura esofágica de 37°C .

Esta biópsia foi realizada sob anestesia geral através de laparotomia mediana de aproximadamente cinco centímetros de extensão. A biópsia retirada à temperatura esofágica de 37°C permite o contróle para cada cão e/ou grupo de cães, nas temperaturas estudadas.

II.2.1. CIRURGIA

II.2.1.1. PRÉ-OPERATÓRIO

O preparo pré-operatório consistiu apenas no jejum dos animais durante um período de 12 a 15 horas antes da cirurgia.

II.2.1.2. ANESTESIA

II.2.1.3. INDUÇÃO DA ANESTESIA

Após rapagem e antissepsia com timerosal a 1:10.000 (MERTHIOLATE) da pata dianteira direita e/ou esquerda,

realizou-se a punção da veia cefálica. A indução anestésica foi feita com tiopental sódico a 2,5% (THIONEMBUTAL) até a perda do reflexo palpebral. Em seguida realizou-se a tubagem orotraqueal sob visão direta. Obteve-se o relaxamento muscular com o emprego de brometo de pancurônio (PAVULON) na dose de 0,2 mg/KG de peso corpóreo e estabeleceu-se a respiração mecânica controlada com respirador de TAKAOKA (mod.600).

II.2.1.4. VENTILAÇÃO PULMONAR

Todos os cães foram ventilados com oxigênio a 100% em um sistema sem re-inalação, com um volume corrente de 20 ml/kg de peso corpóreo e uma frequência respiratória de 20 movimentos respiratórios por minuto.

II.2.1.5. PREPARO DO ANIMAL DE EXPERIÊNCIA

Realizou-se em todos os cães rapagem ampla das regiões lateral-direita do tórax, xifoideia, paracondríaca direita, lombar direita e ilíacas.

A seguir, os cães foram levados a uma mesa cirúrgica especialmente construída nas oficinas do Centro de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas, que passará a ser chamado, aqui, de UNIDADE DE ESFRIAMENTO E AQUECIMENTO.

A Unidade de Esfriamento e Aquecimento, consta de um reservatório com capacidade para 40 litros de água e conectada a tubos e torneiras dispostos de maneira a permitir a circulação de água fria e/ou aquecida. Apresenta, também, uma bandeja móvel, que, ao se elevar ou abaixar-se no interior do reservatório, provoca, respectivamente, a emersão ou imersão do cão durante a cirurgia.

Os cães foram colocados entre dois cobertores de plástico e adequadamente fixados, por meio de cordas finas apropriadas, à bandeja móvel da Unidade de Esfriamento e Aquecimento.

A seguir, realizou-se a antissepsia das regiões rapadas com timerosal a 1:10.000 empregando-se todos os preceitos de técnica asséptica.

Dissecaram-se as artérias e as veias femorais direita e esquerda. Introduziram-se cateteres de polietileno nos vasos femorais à direita. O cateter colocado na veia femoral foi ligado a um manômetro de água para a medida de pressão venosa com o zero ao nível do átrio direito. O cateter colocado na artéria femoral direita foi conectado a um manômetro de mercúrio para verificação da pressão arterial média. Os cateteres serviam, ainda, para colheita das amostras de sangue, com as quais fo-

ram realizadas as dosagens laboratoriais. Introduziu-se também cateter de polietileno na veia femoral esquerda para administração de drogas e de soluções eletrolíticas durante a cirurgia.

A artéria femoral esquerda foi preparada para a via arterial da circulação extracorpórea.

Em todos os cães foi realizada a sondagem vesical, com sonda apropriada, para controle da diurese.

A temperatura do cão, medida no esôfago, e da água contida na Unidade de Esfriamento e Aquecimento foram verificadas constantemente, por meio de um tele-termômetro modelo 43 T D (YELLOW SPRINGS INSTRUMENT CO., INC.)

II.2.1.6. MANUTENÇÃO DA ANESTESIA

A anestesia foi mantida com citrato de fentanil (FENTANIL) intravenoso, na dose inicial de 2 ml/kg de peso corpóreo seguida de doses repetidas correspondentes a 1/3 da dose inicial. Desta maneira, os cães permaneceram entre o primeiro e o segundo planos do terceiro período anestésico. Doses repetidas, intravenosas, de brometo de pancurônio também foram necessárias a cada 30 minutos para evitar a recuperação do tônus muscular do cão.

II.2.1.7. VIA DE ACESSO

Em todos os cães foi realizada, por planos anatômicos e com cuidadosa hemostasia, a toracotomia lateral direita através do quarto espaço intercostal, e a laparotomia mediana.

A laparotomia mediana foi realizada à temperatura esofágica de 37°C numa extensão de aproximadamente cinco centímetros, sendo utilizada para retirada da biópsia hepática que serviu para o controle de cada cão e/ou grupo de cães. Após a retirada da biópsia hepática de controle, a pele, tecido celular subcutâneo e aponevrose foram aproximados com fios de algodão 00. À temperatura esofágica de 28°C, os pontos da laparotomia mediana foram retirados, expondo o lobo esquerdo do fígado, para a biópsia e realizada a toracotomia em uma extensão suficiente para uma adequada exposição do campo operatório, para a instalação da circulação extracorpórea.

II.2.1.8. BIÓPSIAS DO FÍGADO

Em cada animal foram realizadas seis biópsias na periferia do lobo esquerdo do fígado. As biópsias foram retiradas próximas umas das outras, de aproximadamente 0,5 cm. de largura por 0,8 cm. de comprimento, com bisturi lâmina 15 e pinça vascular "De Bakey".

A primeira biópsia foi retirada à temperatura esofágica de 37°C; a segunda a 28°C; a terceira a 20°C; a quarta a 20°C, após período de parada circulatória total ou de baixo fluxo sanguíneo sistêmico de 50 minutos e início do aquecimento; a quinta a 28°C de aquecimento e a sexta biópsia à temperatura esofágica de 37°C.

Os fragmentos foram fixados em solução de aldeído glutárico a 2,0% em tampão de cacodilato de sódio (ph 7,4), para exame à microscopia eletrônica.

Os locais de retirada dos fragmentos foram suturados com pontos em "U" separados utilizando-se fio de catégute 4-0 cromado.

II.2.1.9. CIRCULAÇÃO EXTRACOR- PÓREA

Após a abertura do tórax, a veia ázigos foi laqueada e as veias cava foram dissecadas e reparadas com cadarços finos de algodão em seus segmentos extrapericardícos. Os cadarços das veias cava foram passados através de tubos de látex, de modo a permitir a oclusão das mesmas em torno das cânulas de drenagem venosa.

A seguir, seccionou-se o pericárdio longitudinalmente, e as bordas do mesmo fixadas aos planos externos da incisão.

A aorta ascendente foi isolada e reparada com cadarço fino de algodão. A seguir, foram feitas duas suturas em bolsa com fio "ethibond" 3-0, uma na aurícula direita e outra na parede do átrio direito próxima à veia cava inferior. Os fios das suturas em bolsas foram passados através de tubos de látex com a finalidade de garantirem a hemostasia ao redor das cânulas venosas. As cânulas foram introduzidas em ambas as veias cava, após a atriotomia e a auriculotomia, em cada espaço delimitado pelas bolsas.

A artéria femoral esquerda, previamente dissecada e reparada com cadarços finos de algodão, foi utilizada para a via arterial da circulação extracorpórea.

A incoagulabilidade do sangue foi obtida pela administração de heparina na dose inicial de 3 mg/kg. de peso corpóreo por via intra-atrial direita e complementada, quando necessário, a cada 60 minutos de perfusão na dose de 1 mg/kg. de peso corpóreo.

A canulação das veias cava foi realizada com tubos de polietileno com 1/4 de polegada de diâmetro interno. Na

artéria femoral esquerda foi introduzida uma cânula de polietileno, previamente conectada a uma cânula metálica de diâmetro interno de 6 mm., que foi ligada à linha arterial do conjunto coração-pulmão artificial.

Quando necessário, durante a circulação extracorpórea, foram administradas drogas para correção dos desvios do estado ácido-básico do sangue.

Iniciada a circulação extracorpórea, foram apertados os torniquetes das veias cava, interrompida a ventilação pulmonar e mantidos os pulmões insuflados com uma pressão média de 15 cm de água.

Nos casos em que ocorreu a fibrilação ventricular, foram os cães tratados com choque elétrico de até 30W/s com corrente contínua por meio de um desfibrilador marca SIEMENS.

Durante as fases de uso da circulação extracorpórea colocou-se um cateter de polietileno no átrio esquerdo, que foi conectado a um manômetro de água para medida de pressão, mantendo-a entre 10 a 15 centímetros de água e não a deixando ultrapassar de 10 centímetros de água além dos valores acima mencionados na fase final do experimento.

Terminado o experimento os animais foram sacrificados.

II.2.1.10. CONJUNTO CORAÇÃO-PULMÃO ARTIFICIAL

Utilizou-se para a movimentação do sangue a bomba de roletes tipo "De Bakey" fabricada nas oficinas do Instituto de Cardiologia do Estado de São Paulo.

Obteve-se a oxigenação do sangue com um oxigenador de bolhas modelo proposto por MAGALHÃES & JATENE, tamanho pediátrico, contendo um termopermutador incorporado integralmente ao oxigenador, fabricado nas oficinas do Centro de Tecnologia da Universidade Estadual de Campinas.

Na câmara de desborbulamento foram utilizadas esponjas de aço siliconizadas.

A tubulação empregada foi de polietileno com 1/4 de polegada de diâmetro interno para o circuito artério-venoso e para os aspiradores, com exceção das partes submetidas aos roletes da bomba arterial e dos aspiradores "intracardíacos" nas quais utilizaram-se tubos de látex de 3/8 de polegada de diâmetro interno.

II.2.1.11. PERFUSATO

O perfusato foi constituído de uma solução de Ringer no volume de 500 ml. a qual acrescentou-se sulfato de magnésio a 10% 5 ml., e 25 mg. de heparina. Não foi utilizado sangue durante a perfusão.

Em todos os casos, utilizou-se oxigênio a 100% no oxigenador, durante a perfusão, com um fluxo de quatro litros de oxigênio por metro quadrado de superfície corpórea ($4 \text{ l/O}_2/\text{m}^2$).

O fluxo sanguíneo variou conforme a técnica de hipotermia profunda geral de indução externa e interna utilizada.

II.2.1.12. CARDIOPLEGIA

Nas duas técnicas de hipotermia profunda, a parada cardíaca foi induzida por solução de cardioplegia hiperpotássica, hiperosmótica e hipotérmica (à temperatura de 4°C) contendo: solução de Ringer Lactato 500 ml; solução de cloreto de potássio a 19,1%, 4 ml.; solução de bicarbonato de sódio a 10%, 8 ml.; solução de glicose a 50%, 15 ml e insulina simples 10 U.I..

A infusão de solução de cardioplegia foi feita, imediatamente após o pinçamento da porção ascendente da aorta, por punção direta da sua porção proximal com um cateter descartável no espaço delimitado por uma sutura em bolsa com fio "Ethibond" 5-0 guarnecido com um torniquete plástico para controle da hemostasia. A solução de cardioplegia foi retirada do circuito extracorpóreo através de um aspirador colocado no interior do átrio direito.

O frasco contendo a solução de cardioplegia foi colocado à 1,36 m. acima do coração, gerando assim uma pressão intra-aórtica aproximada de 100mm.Hg. para garantir a perfusão das artérias coronárias.

Em média 100 a 150ml. de solução foram injetados, rapidamente, produzindo o cessamento da atividade mecânica e/ou elétrica do coração. A mesma foi repetida quando necessário.

II.2.1.13. TÉCNICA DE HIPOTERMIA PROFUNDA GERAL DE INDUÇÃO EXTERNA E INTERNA COM PARADA CIRCULATÓRIA TOTAL POR PERÍODO DE 50 MINUTOS (GRUPO I).

Os cães, envolvidos em dois cobertores de plástico, foram fixados adequadamente, por meio de cordas finas apropriadas, sobre a bandeja móvel da Unidade de Esfriamento e Aquecimento.

No reservatório da Unidade de Esfriamento e Aquecimento havia água à temperatura entre 2° a 4°C. Colocou-se sobre os cães sacos de plástico contendo gelo. A seguir, procedeu-se à imersão parcial dos cães deixando para fora os membros e a cabeça. Procurou-se, com isso, evitar acidentes necrotizantes das extremidades. Iniciou-se o gotejamento lento por via intravenosa de dextran de peso molecular 40.000 na dose de 10 ml./Kg de peso corpóreo até a temperatura esofágica atingir 28°C, quando, foi interrompido o esfriamento por condução pela emersão da bandeja móvel da Unidade de Esfriamento e Aquecimento, retirado o cobertor de plástico superior, os sacos de plástico com gelo, repetida a antissepsia com timerosal a 1:10.000 e realizada a toracotomia direta, no quarto espaço intercostal. A veia ázigos foi laqueada e as veias cava dissecadas em seus segmentos extrapericárdico e reparadas com cadarços finos de algodão. Os cadarços das veias cava foram passados através de tubos de látex de modo a permitir a oclusão das mesmas. A seguir, foi seccionado o pericárdio longitudinalmente, sendo as bordas da serosa fixadas aos planos externos da incisão. A aorta ascendente foi isolada e reparada com cadarço fino de algodão. Fez-se uma sutura em bolsa na raiz da aorta ascendente com fio "Ethibond" 5-0 para a realização da cardioplegia, conforme já exposto. Introduziu-se um cateter de polietileno no átrio esquerdo, que foi conectado a um manômetro de água para medida da pressão. A incoagulabilidade do sangue foi obtida pela administração de heparina na dose inicial de 3 mg/Kg de peso corpóreo por via intra-atrial direita e repe-

tida a cada 60 minutos, quando necessário, 1 mg/Kg de peso corpóreo. Iniciada a circulação extracorpórea, foram apertados os torniquetes das veias cava, interrompida a ventilação pulmonar e mantidos os pulmões insuflados com uma pressão média de 15 cm de água.

Em todos os casos, utilizou-se oxigênio a 100% no oxigenador durante a perfusão, com um fluxo de 4 l/O₂/m² de superfície corpórea e um fluxo sanguíneo calculado de 2,5 l/min./m² de superfície corpórea. A temperatura do perfusato foi mantida à 12°C abaixo da temperatura esofágica.

O esfriamento interno foi interrompido à temperatura esofágica de 22°C pela parada da circulação extracorpórea. O esfriamento prosseguiu espontaneamente por um fenômeno de inércia térmica até a temperatura esofágica variável de 20° a 18°C.

A linha arterial foi pinçada e depois de drenado livremente o sangue do cão para o oxigenador, pela linha venosa, a mesma foi a seguir pinçada.

Conectou-se a linha arterial à linha venosa e iniciou-se a recirculação lenta do perfusato, mantendo-o à temperatura de 23°C.

A aorta ascendente, previamente isolada e reparada com cadarço fino de algodão, foi pinçada e iniciada a infusão de solução de cardioplegia, conforme já exposto anteriormente.

Foram feitas pequenas atriotomias; direita, para a aspiração da solução de cardioplegia, e esquerda, para a aspiração das câmaras cardíacas esquerdas por meio de uma sonda Foley, posicionada em ventrículo esquerdo e conectada a um aspirador "intracardiaco".

Após 50 minutos de parada circulatória total foi mantida a sonda Foley em ventrículo esquerdo conectada a um aspirador "intracardiaco" para a aspiração das câmaras cardíacas esquerdas quando o coração distendia. Restabeleceu-se o circuito extracorpóreo e reiniciou-se a circulação extracorpórea com um fluxo sanguíneo sistêmico de $1,0 \text{ l/min./m}^2$ de superfície corpórea, após retirada do ar da aorta ascendente, das câmaras cardíacas e do pinçamento aórtico. Após a retirada do pinçamento da linha venosa, foi aumentado o fluxo sanguíneo sistêmico para $2,5 \text{ l/min./m}^2$ de superfície corpórea.

A temperatura do perfusato foi mantida a níveis não superiores a $39,5^{\circ}\text{C}$ com um gradiente de temperatura de 12°C entre as temperaturas esofágicas e a do perfusato. Durante a fase de aquecimento interno, os pulmões foram reinsuflados

periodicamente para a retirada de possíveis resíduos de ar, e a sonda Foley mantida até obter-se uma contratilidade miocárdica efetiva, quando foi retirada. Manteve-se o cateter de polietileno em átrio esquerdo para medida de pressão que foi mantida entre 10 a 15 cm. de água.

O aquecimento interno foi mantido até a temperatura esofágica de 34°C, quando foi restabelecida a ventilação pulmonar nos parâmetros pré-circulação extracorpórea. Interrompeu-se gradativamente a circulação extracorpórea, ao mesmo tempo que se fazia o aquecimento por indução externa, isto é, imersão parcial da bandeja móvel no reservatório da Unidade de Esfriamento e Aquecimento que continha água à temperatura de 45°C. Manteve-se esta situação até a temperatura esofágica atingir 37°C.

Foram realizadas infusões por via intra-atrial de cloreto de cálcio a 10% na dose de 2,5 a 5 ml. repetidas quando necessárias.

Um fio eletrodo de marca-passo epimiocárdio foi suturado em parede anterior do ventrículo direito, conectado a um gerador de pulso externo e ligado sempre que havia bradicardia.

Quando ocorreu fibrilação ventricular ou atrial, a mesma foi eletricamente convertida com choque de 20 W/Seg.

Quando necessário, drogas e volume foram administrados por via intravenosa conforme os desvios do estado ácido-básico do sangue e os níveis de pressão do átrio esquerdo, respectivamente.

II.2.1.14. TÉCNICA DE HIPOTERMIA PROFUNDA GERAL DE INDUÇÃO EXTERNA E INTERNA COM PERÍODO DE BAIXO FLUXO SANGUÍNEO ($0,5 \text{ l/min/m}^2$) SISTÊMICO DE 50 MINUTOS (GRUPO II).

Os cães envolvidos em dois cobertores de plástico foram fixados adequadamente por meio de cordas finas apropriadas sobre a bandeja móvel da Unidade de Esfriamento e Aquecimento. A seguir, procedeu-se conforme já exposto para a técnica de hipotermia profunda geral de indução externa e interna

com parada circulatória total (grupo I) até a temperatura esofágica de 22°C, quando foi interrompido o esfriamento interno, estabilizada a temperatura do perfusato em 23°C e reduzido o fluxo sanguíneo sistêmico para 0,5 l/min./m² de superfície corpórea, durante o período de 50 minutos.

O esfriamento prosseguiu espontaneamente por um fenômeno de inércia térmica até a temperatura esofágica variável de 20°C a 18°C.

A aorta ascendente, previamente isolada e reparada com cadarço fino de algodão, foi pinçada e iniciou-se a infusão de solução de cardioplegia, conforme já exposto anteriormente, para o grupo I.

Foram feitas pequenas atriotomias; direita para a aspiração da solução de cardioplegia, e esquerda para aspiração das câmaras cardíacas esquerdas por meio de uma sonda Foley posicionada em ventrículo esquerdo e conectada a um aspirador "intracardiaco". Após 50 minutos de fluxo sanguíneo sistêmico reduzido (0,5 l/min./m²), foi mantido a sonda Foley como acima exposto para aspiração das câmaras cardíacas esquerdas, quando o coração distendia. Aumentou-se o fluxo sanguíneo sistêmico para 1,0 l/min./m² de superfície corpórea, após retirada do ar da aorta ascendente e das câmaras cardíacas. Após a retirada do pinçamento da aorta ascendente, foi aumentado o fluxo sanguíneo sistêmico para 2,5 l/min./m² de superfície corpórea.

A temperatura do perfusato foi mantida a níveis não superiores a 39,5°C com um gradiente de temperatura de 12°C entre as temperaturas esofágica e do perfusato.

Durante o aquecimento interno, os pulmões foram reinsuflados periodicamente para retirada de possíveis resíduos de ar, e a sonda Foley mantida até obter-se uma contratilidade miocárdica efetiva, quando foi retirada. Conservou-se o cateter de polietileno em átrio esquerdo para medida de pressão que foi mantida entre 10 a 15 cm. de água. O aquecimento interno foi mantido até a temperatura esofágica de 34°C quando foi restabelecida a ventilação pulmonar nos parâmetros pré-circulação extracorpórea. Interrompeu-se gradativamente a circulação extracorpórea, ao mesmo tempo que se fazia o aquecimento por indução externa, isto é, imersão parcial da bandeja móvel no reservatório da Unidade de Esfriamento e Aquecimento, que continha água à temperatura de 45°C. Manteve-se esta situação até a temperatura esofágica atingir 37°C.

Foram realizadas infusões por via intra-atrial de cloreto de cálcio a 10% na dose de 2,5 a 5 ml., repetidas quando necessárias.

Um fio eletrodo de marca-passo epimiocárdio foi suturado em parede anterior do ventrículo direito, conectado a um gerador de pulso externo e ligado sempre que havia bradicardia.

Quando ocorreu fibrilação ventricular ou atrial, a mesma foi eletricamente convertida com um choque de 30 W/s.

Quando necessário, drogas e volume foram administrados, via intravenosa, conforme os desvios do estado ácido-básico do sangue e os níveis de pressão no átrio esquerdo respectivamente.

II.2.1.15. MICROSCOPIA ELETRÔNICA

II.2.1.15.1. EQUIPAMENTO

A microscopia eletrônica foi feita utilizando um microscópio eletrônico modelo EM9S-2 Marca Zeiss da Microscopia Eletrônica do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.

II.2.1.15.2. TÉCNICA UTILIZADA.

A. FIXAÇÃO

Imediatamente após a colheita do fragmento de fígado, o mesmo foi colocado em fixador composto de solução de aldeído glutárico a 2,0% em tampão cacodilato de sódio, com pH 7,4, permanecendo nesta solução pelo período mínimo de três horas, à temperatura ambiente.

Logo após, foi cortado em fragmentos menores, de aproximadamente 1 mm³, sob lupa, e colocado no fixador pelo período de uma hora.

B. PÓS-FIXAÇÃO

Após quatro horas de fixação os fragmentos passaram por três banhos, repetidos a intervalos de 10 minutos, em solução tampão de cacodilato de sódio com pH 7,4. Em seguida, o fragmento de fígado foi fixado em solução de tetróxido de ósmio a 1,0% em tampão de cacodilato de sódio, durante 45 minutos, à temperatura ambiente.

C. IMPREGNAÇÃO POR SAL DE URÂNIO

Após fixação ósmica, os fragmentos foram lavados com tampão cacodilato, em banhos repetidos de 10 minutos de duração pelo período de 30 minutos. A seguir, os fragmentos foram submetidos ao processo de impregnação por acetato de uranila a 2,0% por tempo variável de 2 a 12 horas.

D. DESIDRATAÇÃO

Os fragmentos de fígado foram desidratados em bateria de etanol, com concentrações crescentes, e a última etapa da desidratação foi em acetona.

E. INFILTRAÇÃO E INCLUSÃO

Os fragmentos foram infiltrados com soluções progressivamente mais concentradas de acetona e POLYLITE 8001 e depois incluídos com POLYLITE 8001 puro, mantido durante dois dias em estufa a 60°C.

F. MICROTOMIA

Os cortes obtidos no micrótomo foram orientados, com o auxílio da microscopia óptica após coloração com azul de metileno e azur II, permitindo uma visão panorâmica do material que seria estudado à microscopia eletrônica.

Com esta finalidade escolheram-se cortes com 1,0 micrômetro de espessura. Os cortes escolhidos para microscopia eletrônica não apresentaram espessura superior a, aproximadamente, 80 nanômetro.

Os cortes para microscopia eletrônica foram colhidos em grades de cobre de 400 malhas.

G. IMPREGNAÇÃO POR CHUMBO

Os cortes ultrafinos foram submetidos a impregnação com citrato de chumbo por sete minutos.

H. MICROSCOPIA

Os cortes foram examinados ao microscópio eletrônico Modelo 9S-2 - Zeiss.

I. ELETROMICROGRAFIAS

As eletromicrografias, em negativo, foram obtidas utilizando no aparelho, película kodalith ortocromática tipo 3.

III. RESULTADOS

Os dados referentes ao tempo de duração da perfusão para as técnicas de hipotermia profunda geral empregadas encontram-se na tabela II.

TABELA II

valores médios do tempo total de perfusão

GRUPO	Nº DE CÃES	TEMPO TOTAL DE PERFUSÃO VALOR MÉDIO (MINUTO)
I	06	38,67 ± 2,58
II	06	39,67 ± 1,97 (50) = 89,67 ± 1,97

Os dados referentes ao tempo de esfriamento até 20° C a 18° C e de aquecimento até a temperatura final de 37° C encontram-se na TABELA III.

TABELA III

Valores médios dos tempos de esfriamento e aquecimento

grupo	técnicas de hipotermia profunda	Tempo de esfriamento (valor médio-minutos)	tempo de aquecimento (valor médio-minutos)
-------	------------------------------------	---	---

I	hipotermia profunda geral de indução externa e interna com parada circulatória total por período de 50 minutos.	externa $64,67 \pm 6,06$ interna $17,50 \pm 1,30$	interna $21,27 \pm 1,47$ externa (34-37°C) $21,50 \pm 1,05$
---	---	--	---

II	hipotermia profunda geral de indução externa e interna com período de baixo fluxo sanguíneo (0,5 L/min/m ²) sistêmico de 50 minutos	externa 58,67 $\pm 5,13$ interna 17,83 $\pm 1,47$	interna $21,83 \pm 1,17$ externa (34-37) $20,67 \pm 1,21$
----	---	--	---

Foram estudados à microscópio eletrônica fragmentos de fígado de todos os cães submetidos às técnicas de hipotermia profunda geral utilizadas.

Os resultados demonstraram, à ultra-estrutura, ausência de alterações morfológicas dos elementos que compõem o parênquima hepático, nas várias temperaturas e em ambos os grupos estudados.

Os hepatócitos em ambos os grupos, apresentam-se morfológicamente normais, onde se notam núcleos com posição central e sua cromatina regularmente distribuída com condensação ao longo da membrana nuclear. (FIG.1).

As organelas do citoplasma dos hepatócitos mostram mitocôndrias presentes com sua matriz homogênea eletrodensa; lisossomas, e retículo endoplasmático rugoso, formando uma rede, com cisternas paralelas e fazendo continuidade com a membrana nuclear.

Os canalicúlos biliares apresentam-se íntegros, livres da presença de elementos que caracterizam sua obstrução (FIG.2).

O espaço de Disse, em ambas as técnicas empregadas, também não apresentam sinais de desorganização, estando

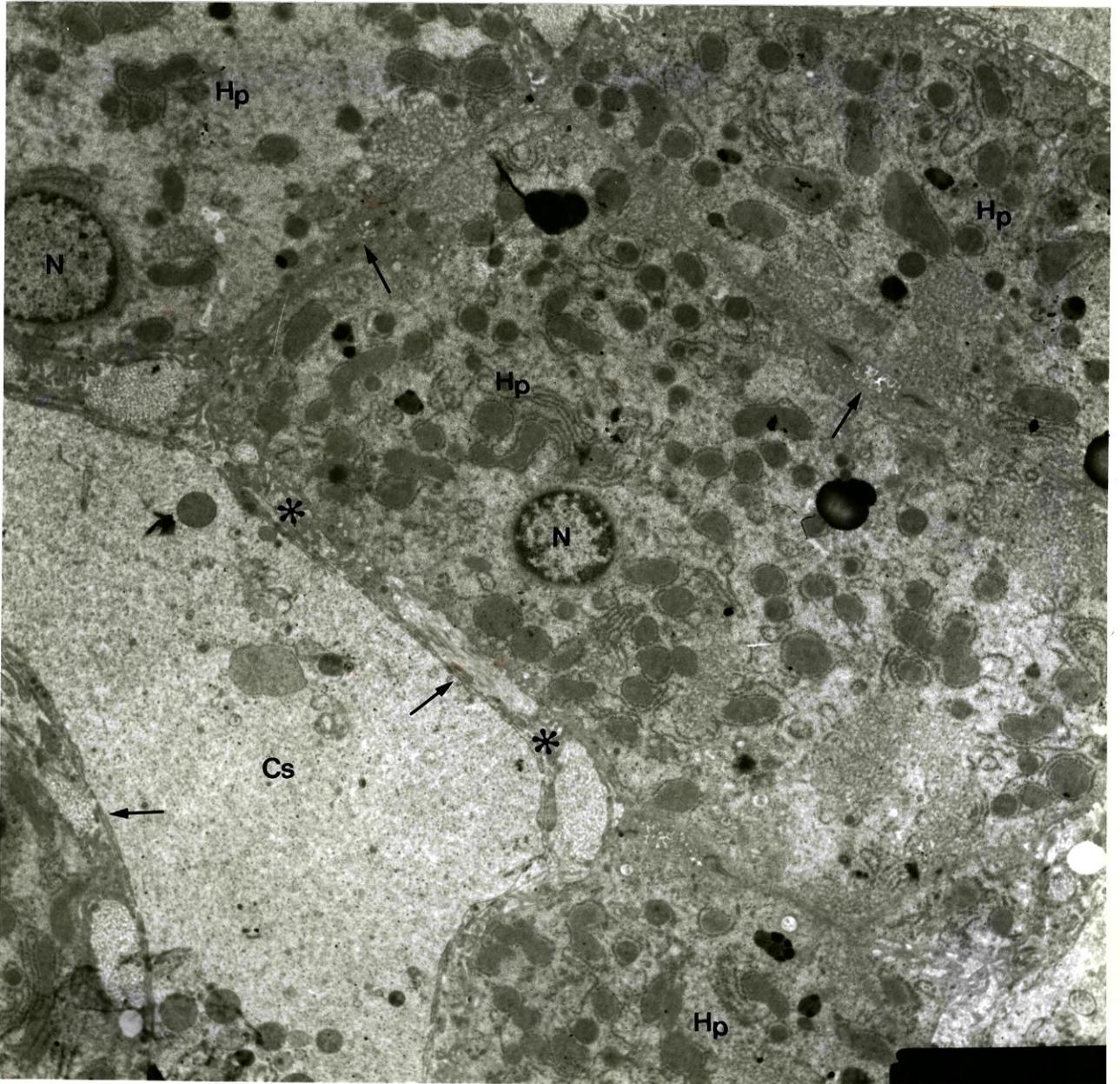
presentes as suas estruturas componentes usuais desta região; (FIG.3) revestimento endotelial dos capilares sinusóides não apresenta alterações morfológicas ou de topográfica (FIG.3 e 4). No interior dos capilares sinusóides foram encontrados, além das células sanguíneas normalmente encontradas nessa região, organelas e restos celulares no seu interior (FIG.4 e FIG.5) nos cães submetidos à técnica de parada circulatória total.

F I G U R A 1

MICROGRAFIA ELETRÔNICA DO HEPATÓCITO DO ANIMAL
DO GRUPO I - 37°C

Hp = Hepatócito	N = Núcleo
→ = Canalículo biliar	* = Espaço de Disse
Cs = Capilar Sinusóide	→ = Célula Endotelial

AUMENTO DE .5536 X

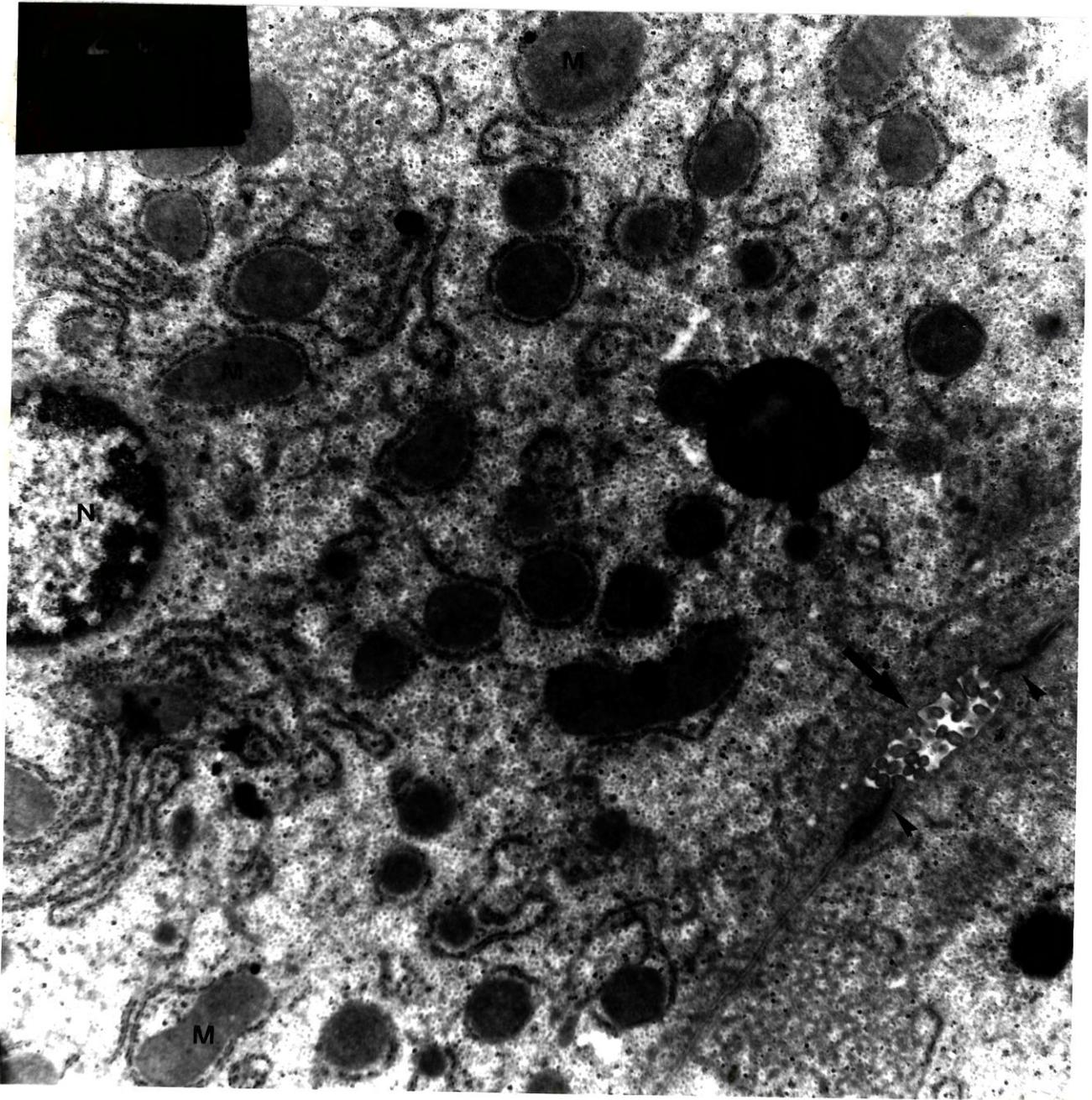


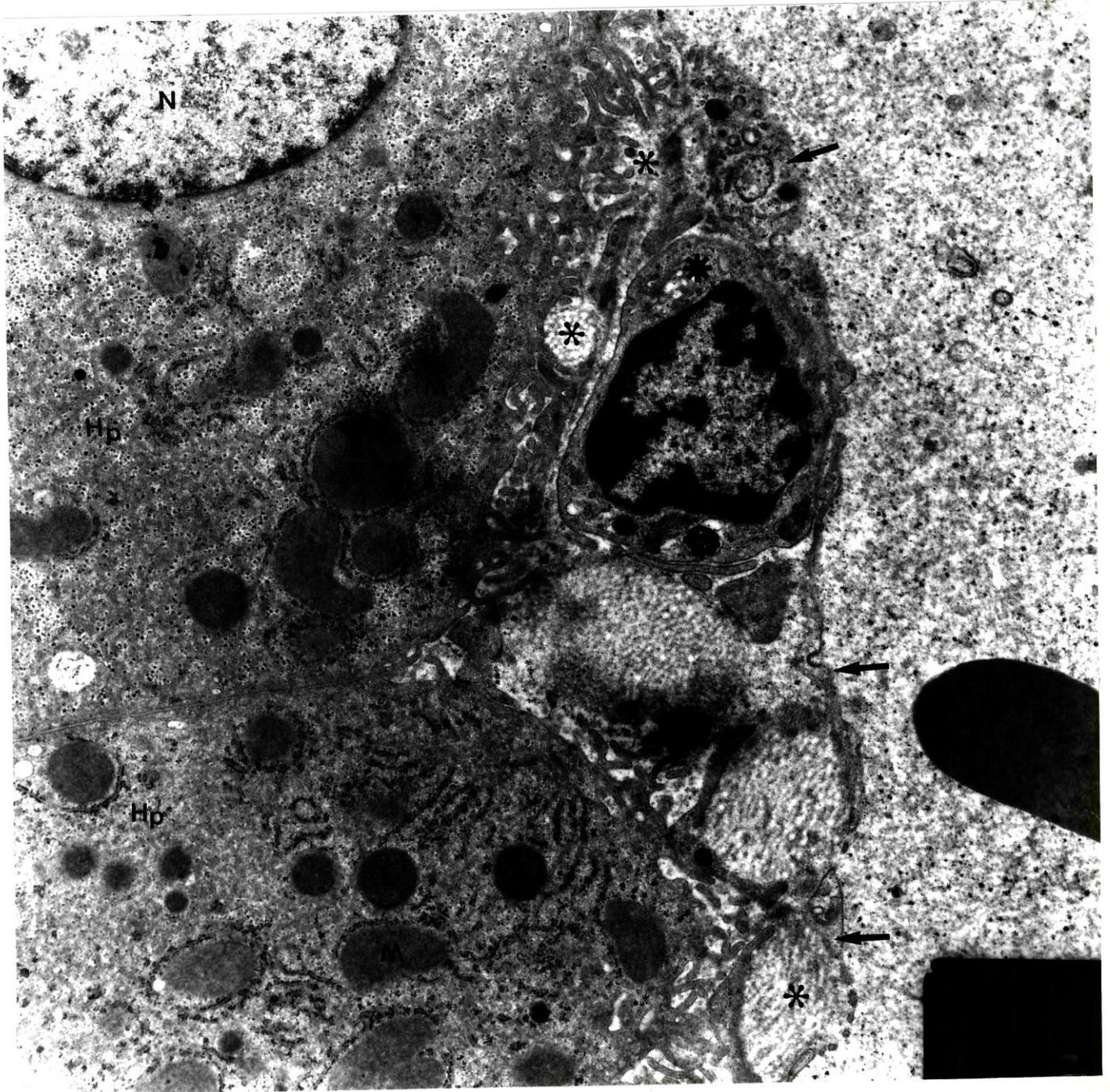
F I G U R A 2

MICROGRAFIA ELETRÔNICA APRESENTANDO DETALHES DO
ASPECTO ULTRA-ESTRUTURAL DO HEPATÓCITO DO ANIMAL
DO GRUPO I - 28°C

N= Núcleo	M= Mitocôndria
➔= Canalículo Biliar	➤= Junções In- ter celulares tipo oclusivo

AUMENTO DE 14080 X





F I G U R A 4

MICROGRAFIA ELETRÔNICA DO ESPAÇO DE DISSE.

GRUPO I - 20°C

PÓS PARADA CIRCULATÓRIA TOTAL DE 50 MINUTOS

H_p = Hepatócito

→ = Revestimento
Endotelial do
sinusóide.

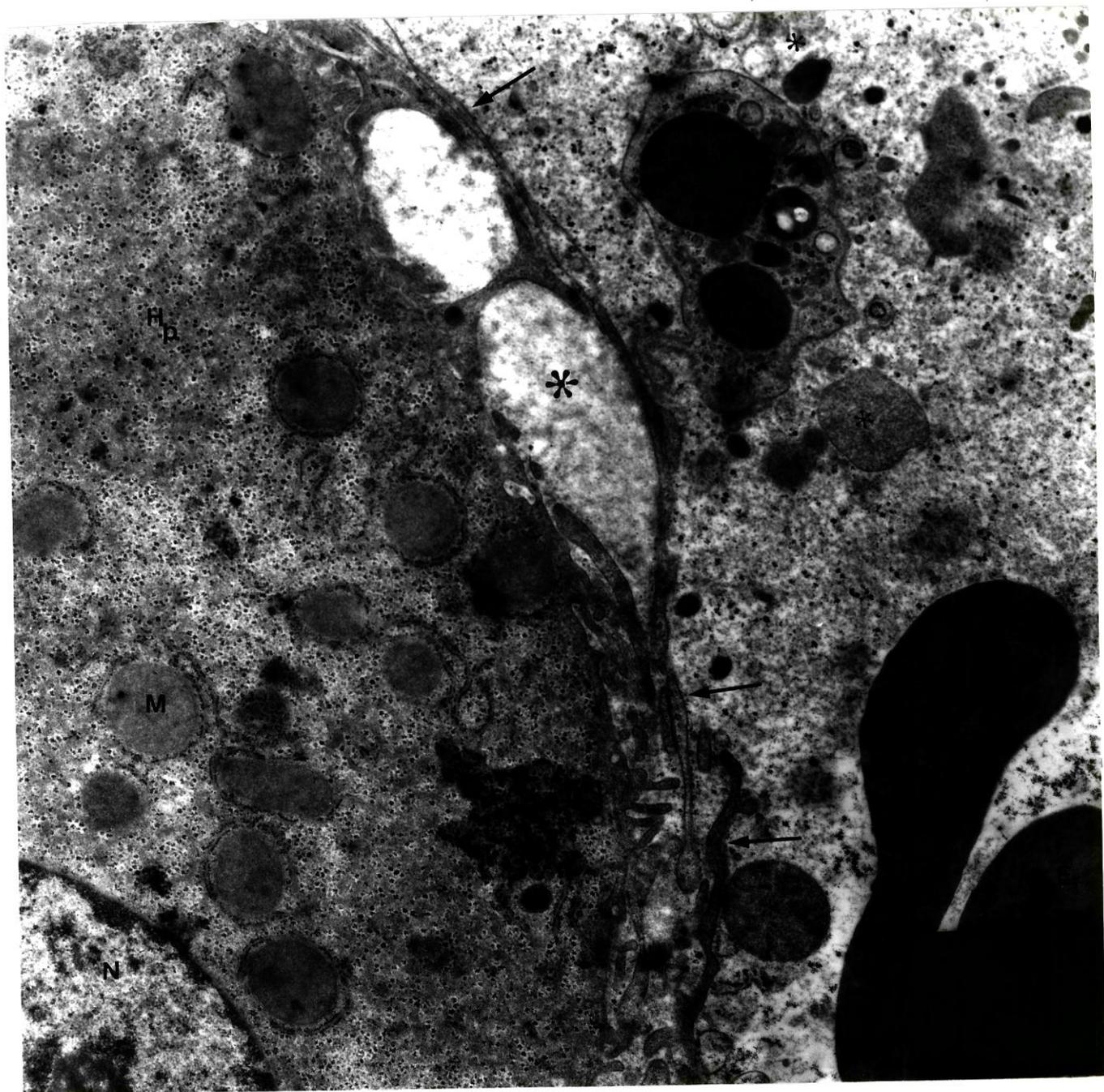
E_r = Eritrócito

* = Espaço de
Disse

* = Organelas e Restos Celulares no interior
do capilar sinusóide

M = Mitocôndria

AUMENTO DE 14080 X



F I G U R A 5

MICROGRAFIA ELETRÔNICA DO CAPILAR SINUSÓIDE.
GRUPO I - 28°C.

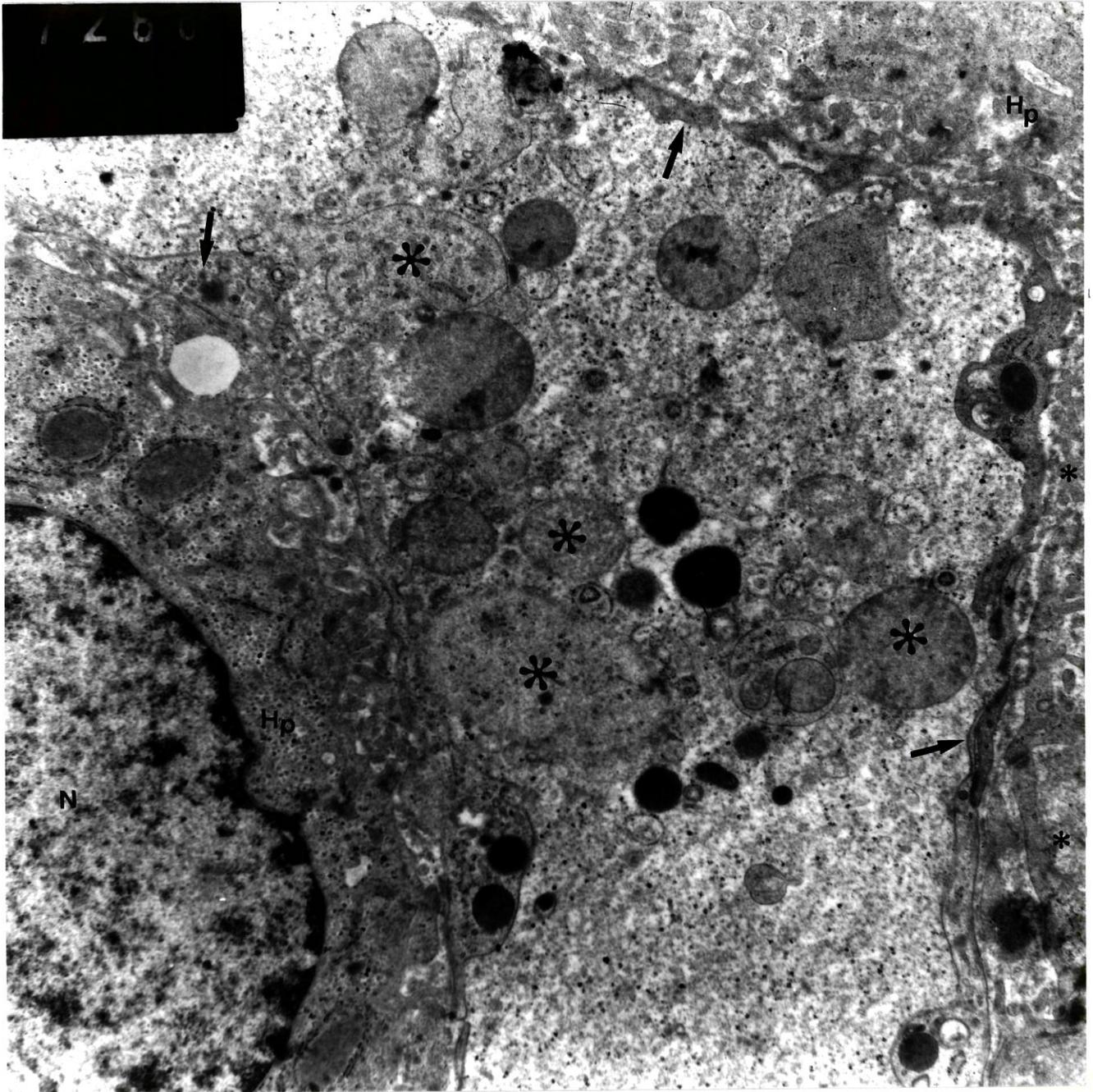
Hp= Hepatócito

*= Organelas e Restos Celulares no interior
do capilar sinusóide

N= Núcleo

→= Revestimento
endotelial.

AUMENTO DE 14080 X

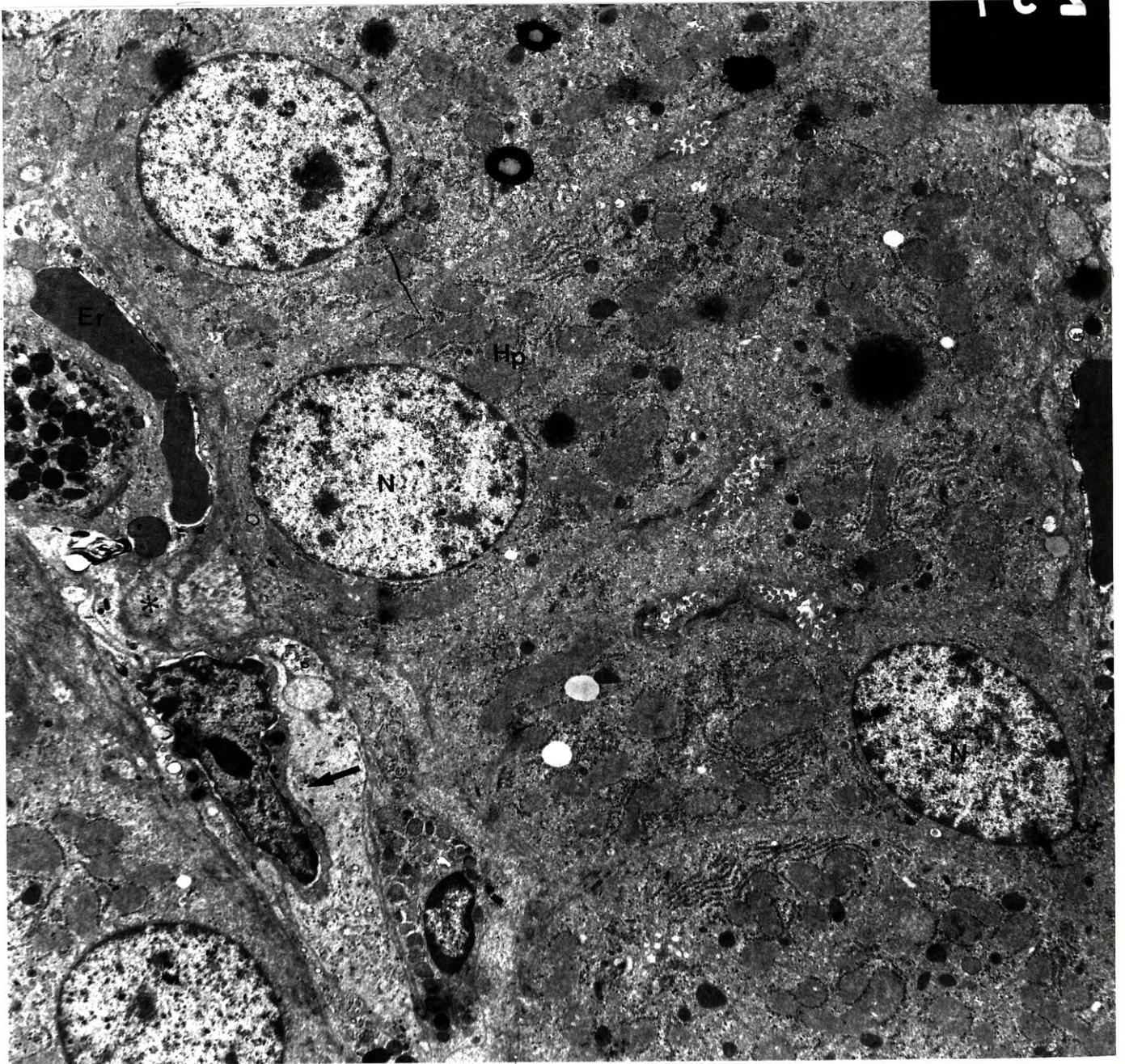


F I G U R A 6

MICROGRAFIA ELETRÔNICA MOSTRANDO ASPECTO GERAL
DO PARÊNQUIMA HEPÁTICO. GRUPO I - 37°C.

Hp= Hepatócito
→ = Célula endotelial
Er= Eritrócito
* = Espaço de Disse
N= Núcleo

AUMENTO DE 6055 X



F I G U R A 7

MICROGRAFIA ELETRÔNICA MOSTRANDO HEPATÓCITO EM
DETALHE. GRUPO II - 37°C.

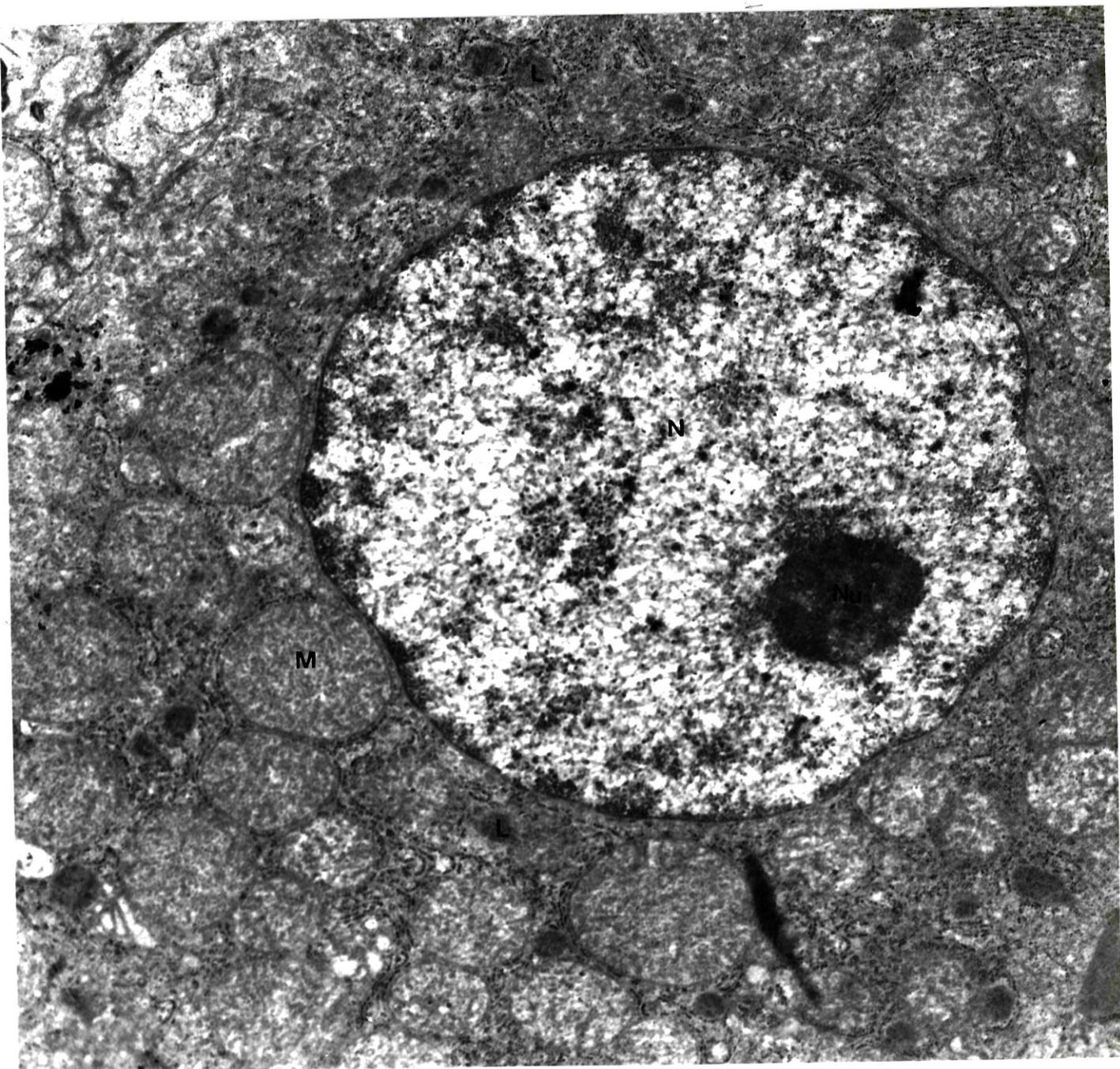
N = Núcleo

Nu = Nucléolo

M = Mitocôndria

L = Lisossoma

AUMENTO DE 15840 X

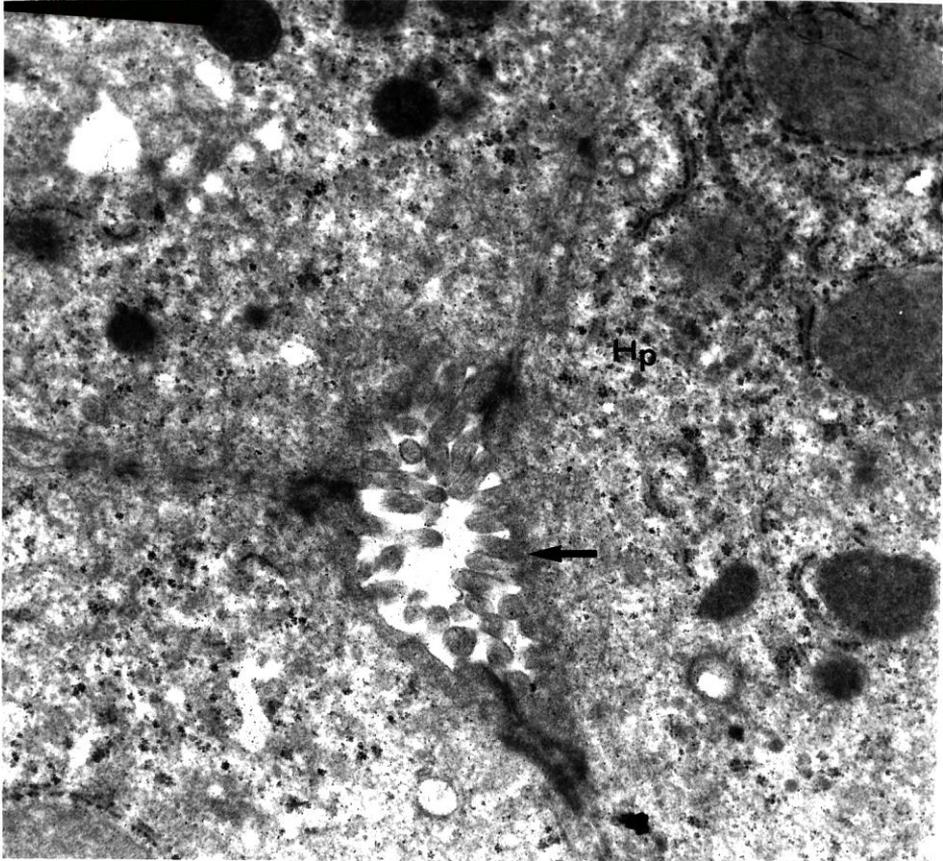


F I G U R A 8

MICROGRAFIA ELETRÔNICA APRESENTANDO DETALHE DO
CANALÍCULO BILIAR ENTRE TRÊS HEPATÓCITOS.
GRUPO II - 28°C.

Hp= Hepatócito
→ = Microvilosidade
L = Lisossoma

AUMENTO DE 21516 X



F I G U R A 9

MICROGRAFIA ELETRÔNICA MOSTRANDO DETALHE DA INTEGRIDADE DO REVESTIMENTO ENDOTELIAL DE VASO DO PARÊNQUIMA HEPÁTICO. GRUPO II - 20°C.

GRUPO II - 28°C.

NOTAR AUSÊNCIA DE FRAGMENTOS NO INTERIOR DO VASO.

Ev= Espaço Vascular

→= Célula Endotelial

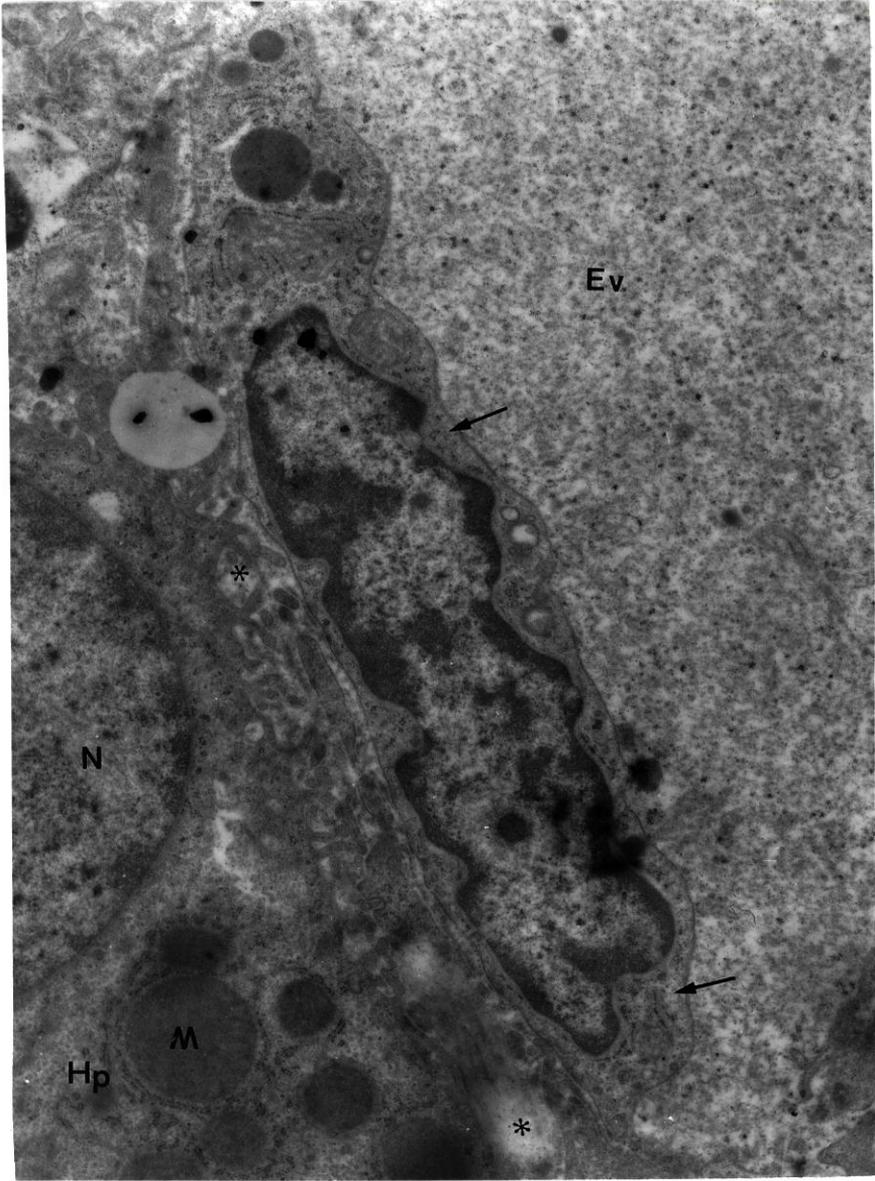
* = Espaço de Disse

H_p= Hepatócito

N= Núcleo

M= Mitocôndria

AUMENTO DE 13200 X

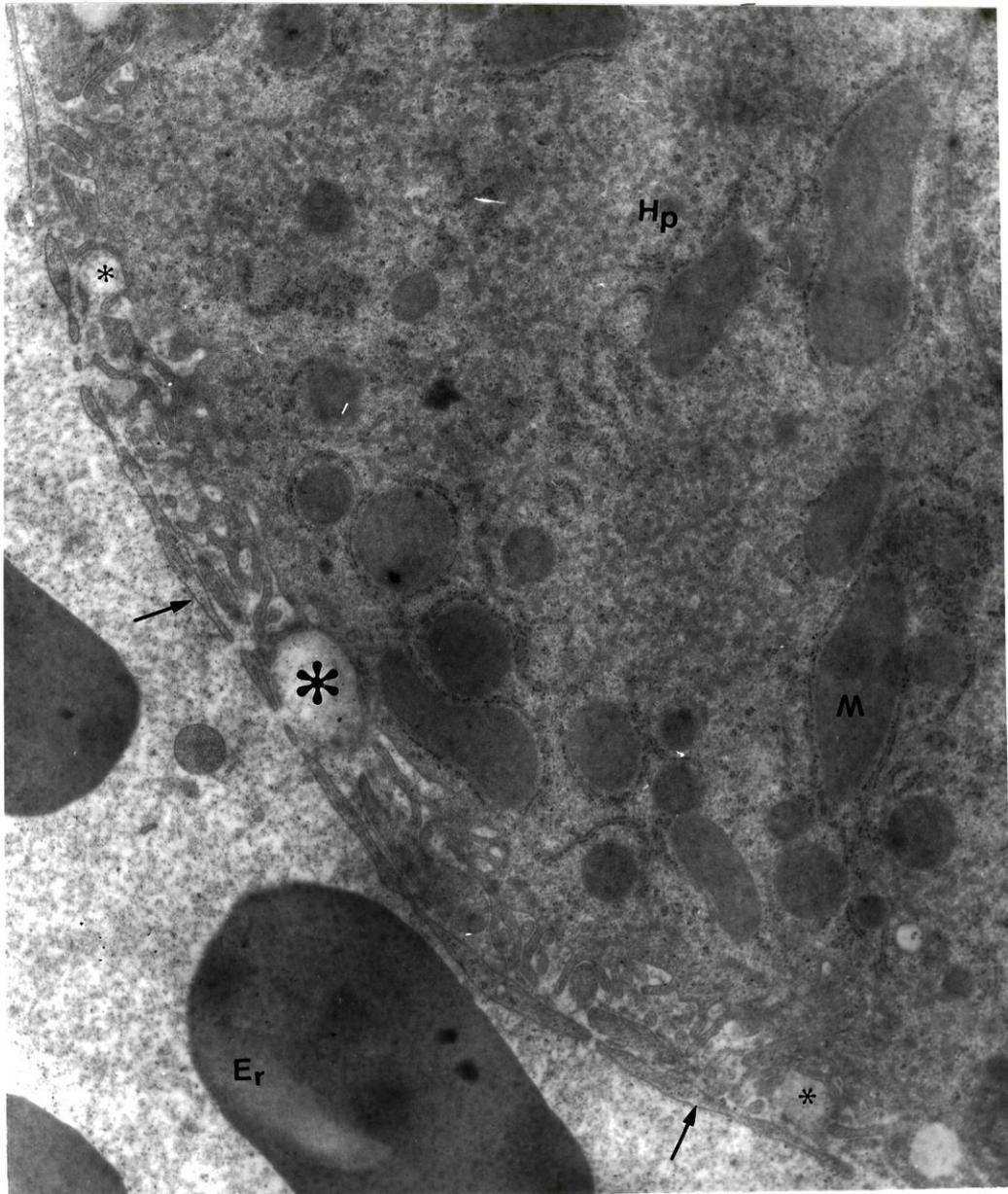


F I G U R A 10

MICROGRAFIA ELETRÔNICA MOSTRANDO DETALHES DO ESPAÇO DE DISSE - GRUPO II - 20°C PÓS- BAIXO FLUXO SANGUÍNEO SISTÊMICO DE 50 MINUTOS.
NOTAR A AUSÊNCIA DE FRAGMENTOS OU RESÍDUOS CELULARES NO INTERIOR DO ESPAÇO VASCULAR.

- * = Espaço de Disse
- = Revestimento célula endotelial
- Er = Eritrócito
- M = Mitochondria

AUMENTO DE 13640 X

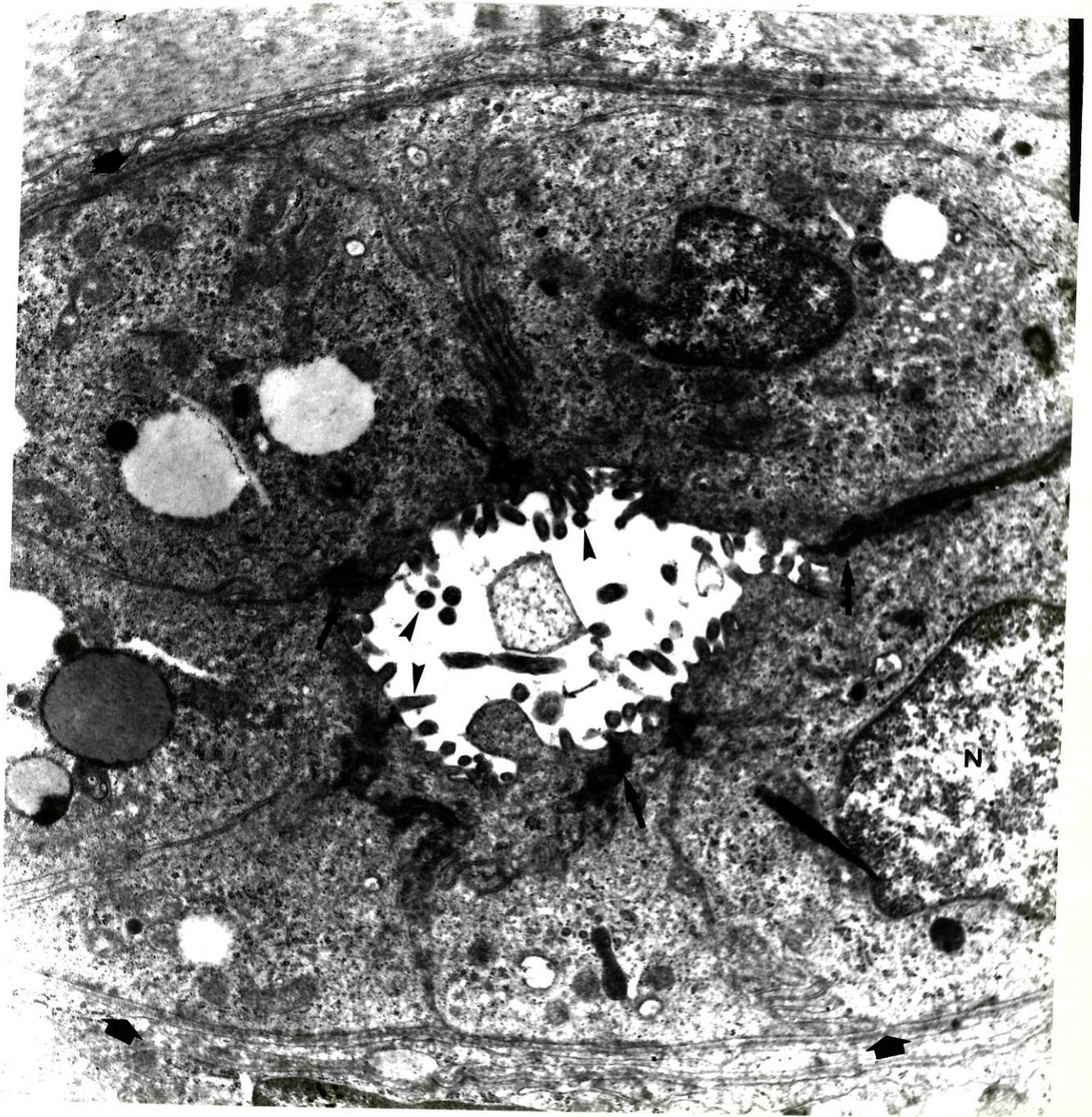


F I G U R A 11

MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE UM DUCTO BILIAR - GRU-
PO II - 28°C

- = Junções do tipo "Adherens" e "Ocludens"
na superfície lateral da região apical
das células.
- ▶ = Microvilosidades N = Núcleo
- ▣ = Membrana basal da célula epitelial do
ducto.

AUMENTO DE 15840 X



F I G U R A 12

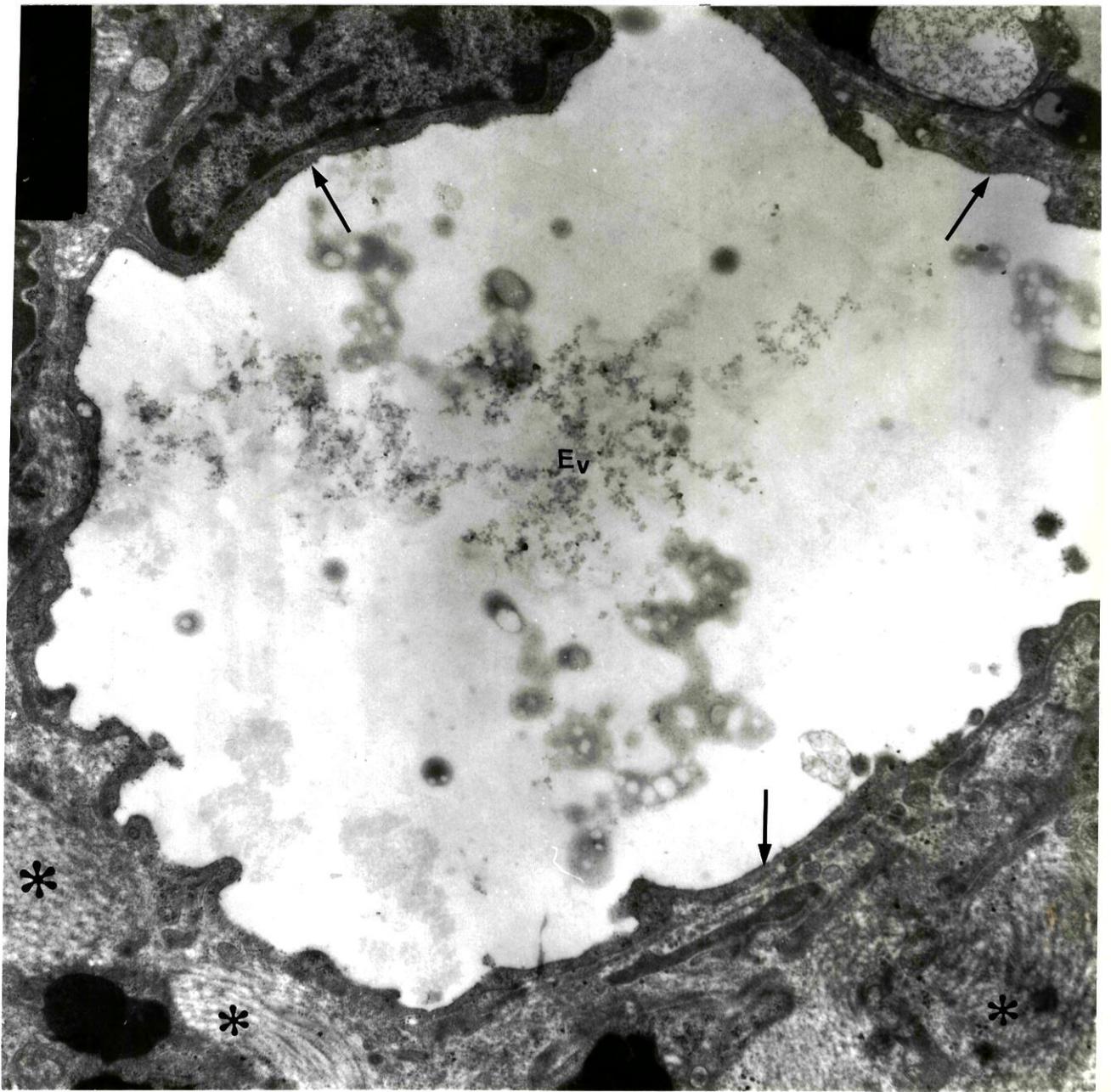
MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VASO SANGUÍNEO DE PE-
QUENO CALIBRE MOSTRANDO INTEGRIDADE DE SEU RE-
VESTIMENTO - GRUPO II - 37°C.

→ = Célula Endotelial

E_v = Espaço Vascular

* = Fibras Colágenas da Túnica Média.

AUMENTO DE 13640 X



IV. DISCUSSÃO

Embora a icterícia seja frequente (10 a 25%) no pós-operatório de cirurgias cardíacas com circulação extracorpórea, segundo OLSON e col. (1984), poucos são os trabalhos na literatura a este respeito a nível de ultra-estrutura do parênquima hepático. A análise das alterações morfológicas descritas na literatura, são comentadas à luz da microscopia óptica, em estudos experimentais, onde autores como KNOCKER e col. (1955) negam que a hipotermia possa trazer alterações da estrutura hepática.

As lesões hepáticas seriam provocadas pela hipotermia segundo a experiência de SARAJAS (1956), demonstrando a nível de microscopia óptica, alteração degenerativa da porção central do lóbulo hepático, alteração essa que foi semelhante aos resultados de FISHER e col. (1957).

RITTENHOUSE e col. (1974), experimentalmente em cães, à nível de microscopia óptica, observaram apenas vacuolizações citoplasmáticas dos hepatócitos, quando esses animais eram submetidos à 90 minutos de parada circulatória total à temperaturas que oscilaram de 18°C a 20°C, nos resultados encontrados por nós em nível de ultra-estrutura, não foram observadas alterações degenerativas na porção central do hepatócito.

FALKMER & KJELLGREN notam que vacúolos pequenos, provavelmente de ácidos graxos livres são frequentemente encontrados no citoplasma dos hepatócitos durante a hipotermia, nas biópsias retiradas desses fígados, entre oito e vinte quatro horas após a hipotermia; sendo interpretados como normais do ponto de vista da microscopia óptica. ALTMANN (1949) acreditava que os vacúolos dos hepatócitos continham proteínas, que entrariam na célula em consequência ao aumento da permeabilidade da membrana celular durante a hipóxia. Comparativamente no nosso material, à nível de ultra-estrutura, não foram observadas essas vacuolizações.

DUNLOP e col. (1962) não encontraram diferenças no conteúdo de transaminase glutâmico-pirúvica em cães operados sob hipotermia (15°C) ou normotermia, com o auxílio da circulação extracorpórea durante um período de 45 minutos, mostrando dessa maneira ausência de alterações do aspecto funcional do fígado. Estudos clínicos recentes de COLLINS e col. (1983) concluem que, como os autores anteriores, a hipotermia não leva a alterações funcionais.

A compatibilidade da hipotermia profunda com a sobrevida já foi sobejamente demonstrada em animais não hibernantes e no homem. Os estudos de TREDE e col. (1961) confirmam essa afirmativa. Repetindo GOLLAN (1959), a condição fundamental e decisiva para se ter sobrevida, com ausência de lesão orgânica estrutural ou funcional, é a adequada perfusão dos órgãos vitais.

Em nosso material sob hipotermia profunda geral de indução interna e externa, não foram observadas alterações, ao nível de ultra-estrutura, em ambos os grupos. Os canaliculos biliares achavam-se livres, os sinusóides hepáticos apresentavam sua organização conservada sem lesão de endotélio ou conteúdo de elementos estranhos no seu interior e o parênquima hepático mantendo sua arquitetura normal.

Os estudos manométricos de ESCALDA e col. (1988) realizados em cães, à 24°C, mostraram que existe uma diminuição do débito da veia porta sem alteração significativa da pressão, e um aumento marcante da resistência vascular portal, devido à contração das estruturas esfinterianas pré-sinusoidais, reafirmando os resultados de trabalho anterior dos mesmos autores realizado em 1985 quando utilizaram a técnica de microangiografia, onde a visualização das capilares intralobulares não foi possível, sendo esse fato interpretado como uma contração das estruturas esfinterianas pré-sinusoidais provocadas pela hipotermia.

Em nosso meio, experimentalmente, OLIVEIRA e col. (1988), através de fluxometria e manometria durante circulação extracorporea em hipotermia e normotermia, concluem que a temperatura é um fator que influencia o fluxo hepático; assim no estado de hipotermia (27°) o fluxo da veia portal e o fluxo hepático total estão significativamente mais altos em comparação com os cães submetidos à normotermia, contrariando os autores anteriores.

Autores como MUNDTH e col. (1967), PEREIRA e col. (1972), ROBINSON e col. (1975) e COLLINS e col. (1983), correlacionaram o aparecimento de icterícia no período pós-operatório com o tempo de perfusão, principalmente acima de 180 minutos, em paciente submetidos à cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea para múltiplas trocas valvares. No nosso material, o tempo de perfusão é menor do que o assinalado pelos autores, período em que não há alterações ao nível de ultra-estrutura.

Por outro lado, BOHMER e col. (1987), demonstram que a incidência de icterícia é mais frequente em pacientes que apresentam no pré-operatório uma deterioração significativa da função cardíaca.

A hemólise é apontada por LOCKEY e col. (1967) e LARMI (1973), como causa de icterícia no período pós-operatório de cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea com diferentes níveis de hipotermia. O excesso de bilirrubina indireta ultrapassa a capacidade excretora do fígado lesado pela circulação extracorpórea, e haveria como consequência regurgitação da bilirrubina conjugada para os capilares sanguíneos, resultando índices altos de bilirrubina conjugada em relação à não conjugada.

O perfil e o nível de icterícia observados após circulação extracorpórea, não se assemelham aos dos processos hemolíticos, porque no primeiro a bilirrubina direta consti-

tui 90% ou mais do total das bilirrubinas, o que não ocorre no segundo caso; há ainda o aparecimento da bilirrubinúria na circulação extracorpórea, segundo SINGH & BAKER (1974).

COLLINS e col. (1983), tendo encontrado aumento de ácido cólico conjugado no soro, em 24 dos 49 pacientes estudados, afirmam que a insuficiência da excreção do canalículo biliar é a causa mais importante para explicar o aparecimento da icterícia pós-operatória. Em nosso meio LAGUDIS e col. (1990), em material humano conclui que a icterícia progressiva por hiperbilirrubinemia direta, pode ocorrer como complicação de cirurgia cardíaca, e refletir defeito no polo excretor do hepatócito, em ausência de obstrução das vias biliares. Tal condição clínica, os autores agrupam em uma síndrome denominada icterícia colestática pós-operatória, cuja causa, segundo os autores, permanece indeterminada na maioria dos pacientes, já que nesse estudo não houve evidência clínica de hepatopatia prévia, irritabilidade hemodinâmica, hipóxia, infecção ou outras anormalidades transoperatórias.

Embora o número de fatores etiológicos sugeridos fossem em grande número, o mecanismo exato da lesão hepática, no paciente submetido à circulação extracorpórea e hipotermia, permanece obscuro, complexo e pobremente entendido (LA MONT E ISSELBACHER, 1985).

No material por nós examinado, não foram encontrados nos canaliculos biliares, nem tampouco nos sinusóides adjacentes indícios de colestase intra-hepática, consequente a hemólise devido à ação da circulação extracorpórea, nos diferentes graus de temperatura a que foram submetidos os animais de experimentação, em ambas as técnicas empregadas, embora os tempos utilizados tanto de parada circulatória total ou de baixo fluxo sanguíneo sistêmico tenha sido de 50 minutos, e de circulação extracorpórea de $38,67 \pm 2,58$ (Grupo I) e de $89,67 \pm 1,97$ (Grupo II).

A hipóxia como causa básica das lesões hepáticas na circulação extracorpórea e hipotermia nos seus diferentes graus, tem base nos trabalhos de KNOCKER e col. (1985).

O choque, segundo SANDERSON e col. (1966), levando à congestão hepática e a anóxia, justificam a icterícia no período pós-operatório da cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea e utilização das técnicas de hipotermia.

ROBINSON e col. (1967), clinicamente, responsabilizam a anóxia hepática pelos óbitos ocorridos, provavelmente pela necrose centrolobular em sua série, e MUNDTH e col. (1967) caracterizam a hipóxia consequente ao baixo débito cardíaco como causa de insuficiência hepática no período pós-operatório.

Segundo LARMI (1973), pode ocorrer icterícia pós-circulação extracorpórea devido à hipóxia, se há queda da pressão arterial sistêmica, ou qualquer distúrbio circulatório com desestabilização hemodinâmica consequente.

Comparado com grupos controles onde foi utilizado fluxos normais durante a perfusão, ANDERSEN e col. (1957) afirmam que com os fluxos reduzidos utilizados em sua série, houve pequena diminuição de fluxo sanguíneo hepático, sem alterações estruturais.

Outros autores como LOCKEY e col. (1967), PEREIRA e col. (1972) relacionam o grau de icterícia no período pós-operatório, na cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea, à pressão venosa central elevada.

COLLINS e col. (1983), OLSON e col. (1984) não referem em sua série a hipóxia como causa de icterícia pós extracorpórea, embora BOHMERT e col. (1987) sugiram essa idéia. Na nossa série, tanto na parada circulatória total ou baixo fluxo sanguíneo sistêmico de $0,5 \text{ l/m/m}^2$ por período de 50 minutos, na indução externa e interna, não foram observadas alterações à nível de ultra-estrutura, pois, como observamos anteriormente, as mitocôndrias apresentam-se com sua matriz homogeneamente eletrodensa, com sua membrana intacta e suas cristas lamelares conservadas.

Os fenômenos desfavoráveis que acompanham a hemodiluição, com alterações na pressão oncótica e osmolaridade sanguínea, diminuindo a quantidade de eritrócitos por milímetro cúbico, levando à hipóxia e consequente lesão do fígado, também são citados por BIERNAT e col. (1974) em estudo feito em cães. No nosso material onde o hematócrito foi mantido em torno de 20-25% não ocorreram dilatações nos capilares sinusóides e no espaço de Disse como descrito por BIERNAT e col. (1974), embora os autores citados utilizaram-se de duas horas de hemodiluição e normotermia enquanto na nossa experiência o tempo foi menor (média de 90 minutos) e foi utilizada a hipotermia, que provavelmente é fator de proteção às estruturas celulares do parênquima hepático.

Os resultados obtidos em trabalho experimental, BACCARIN (1986) em cães submetidos à hipotermia profunda de indução externa e interna com período de baixo fluxo sanguíneo sistêmico ($0,5 \text{ l/min/m}^2$) são idênticos aos resultados à nível de ultra-estrutura aqui encontrados com a utilização de ambas as técnicas, comparativamente.

Embora não tenham sido encontradas diferenças quanto ao aspecto geral do parênquima hepático, no aspecto ultra-estrutural dos hepatócitos ou dos canaliculos biliares em ambos os grupos estudados, da mesma forma não foi identificado o comprometimento do revestimento dos capilares sinusóides ou do espa-

ço de Disse. O fato de ter sido encontrado restos e fragmentos celulares dentro dos capilares sinusóides, pode estar relacionado com a estagnação que ocorre durante a parada circulatória total; não significando com isso que a parada circulatória total seja mais lesiva que o baixo fluxo sanguíneo sistêmico, já que não foram encontradas, para sua comprovação, diferenças quanto ao estado de preservação e de higidez dos elementos do parênquima hepático.

Os resultados obtidos neste material experimental permitem inferir morfológicamente, fase à microscopia eletrônica, a ausência de alterações funcionais ao nível de sinusóides, espaço de Disse, assim como canaliculos e ductos biliares, porque há preservação dos mesmos em ambas as técnicas empregadas, mantendo ainda o hepatócito a sua estrutura intacta com núcleo bem diferenciado e organelas citoplasmáticas normais.

V. CONCLUSÕES

1) O estudo experimental, em cães, das estruturas componentes do parênquima hepático com as técnicas de hipotermia profunda geral de indução externa e interna, com parada circulatória total por período de 50 minutos, permite concluir que não ocorrem alterações morfológicas, evidenciadas à microscopia eletrônica, nos diferentes níveis de temperatura estudadas.

2) A técnica de baixo fluxo sanguíneo sistêmico ($0,5 \text{ l/min/m}^2$) por período de 50 minutos, permite concluir que não ocorre observações morfológicas, evidenciadas à microscopia eletrônica, nos diferentes níveis de temperatura estudadas.

VI. RESUMO

Foram estudados experimentalmente as alterações da ultra-estrutura hepática em doze cães submetidos à circulação extracorpórea com uso de hipotermia profunda de indução externa e interna, sendo o grupo I composto por seis cães, submetidos à parada circulatória total de 50 minutos e no grupo II, também composto por seis cães utilizando-se baixo fluxo sanguíneo sistêmico ($0,5 \text{ l/min/m}^2$) por período também de 50 minutos.

Foram colhidas biópsias regularmente nos dois grupos na fase de esfriamento a 37°C , 28°C e 20°C . Após 50 minutos de parada circulatória total ou de baixo fluxo sanguíneo sistêmico ($0,5 \text{ l/min/m}^2$) foram colhidas mais três biópsias na fase de aquecimento às mesmas temperaturas.

Não foram observadas alterações à nível de ultra-estrutura do parênquima hepático nas temperaturas estudadas em ambas as técnicas empregadas.

VII - SUMMARY

Ultrastructural effects in the liver were studied on 12 dogs submitted to profound hypothermia and extracorporeal circulation. The animals were divided into two groups. Group I the dogs were maintained on cardiac arrest for a period of 50 minutes. Group II the dogs were maintained on low flow rate for a period of 50 minutes.

Three biopsies were taken at 37, 28 and 20 degrees centigrades. The dogs of group I were maintained on cardiac arrest for a period of 50 minutes. The dogs of group II were maintained on by-pass at 20°C on low flow rate (0,5 l/min/m²) for a period of 50 minutes. Rewarming was then started and three more biopsies were taken at the same temperatures in two groups.

No changes were noted on the ultrastructure of the liver at the studied temperatures in two groups with no difference between the groups.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- ANDERSEN, M.N; NORBERG, B. & SENNING, A. - Studies of liver function during extracorporeal circulation with low flow rate. Surgery, 43:397-407, 1958.
- ALTMANN, H.W.: Frankf. Ztschr. Path. 60, 376 (1949)- Apud Falkmer, S. & Kjellgren, J. - Acta Med. Upsal., 60:199, 1955.
- BACCARIN, V. - Estudo da Ultra-Estrutura Hepática em Cirurgia Cardíaca com Técnica de Hipotermia Profunda Geral - Trabalho apresentado para conclusão do Curso de Mestrado na Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP - 1986.
- BARRAT-BOYES, B.G.; SIMPSON, M. & NEUTZE, J.M. - Intracardiac surgery in neonates and infants using deep hypothermia with surface cooling and limited cardiopulmonary bypass. Circulation, 43 & 44 (Suppl.1) : I-25 - I-30, 1971.
- BERNHARD, W.F.; MCMURREY, J.D. & CURTIS, G.W. Feasibility of Partial Hepatic Resection Under Hypothermia. New England J. Med., 253:159, 1955.
- BIERNAT, S.; KULIG, A.; LEPERT, R.; ORLOWSKI, T. Pathomorphologic and histochemical changes in the liver during hemodilution. Am. J. Surg., 128:24-30, 1974.

- BIGELOW, W.G.; LINDSAY, W.K. & GREENWOOD, W.F. - Hypothermia - Its possible role in cardiac surgery: an investigation of factors governing survival in dogs at low body temperatures. Ann. Surg. 132 : 849-866, 1950.
- BOEREMA, I.; WILDSCHUT, A.; SCHIMIDT, W.J.H. & BROCHUYSEN, L. - Experimental research into hypothermia as an aid in the surgery of the heart. Arch. Chir. Neerl., 3: 25-34, 1951.
- BOHMER, T.; ELGJO, K.; HOVIG, T.; JACOBSEN, C.D.; BAKKEN, A.; SKAGSETH, E.; SKREDE, S. - Postoperative jaundice in patients undergoing cardiac surgery. J. Oslo City Hosp., 37: 135-42, 1987.
- COLLINS, J.D.; BASSENDINE, M.F.; FERNER, R.; BLESOVSKY, A.; MURRAY, A.; PEARSON, D.T. & JAMES, O.F.W. - Incidence and prognostic importance of jaundice after cardiopulmonary bypass surgery. The Lancet, May 21: 1119-1123, 1983.
- DELORME, E.J. - Experimental cooling of the blood stream. The Lancet, 263: 914-915, 1952.
- DILL, D.B.; FORBES, W.H. - Effects of cold in animals. - Amer. J. Physiol., 132 : 685, 1941.

- DILLARD, D.H.; MOHRI, H. & HESSEL, E.A.II - Correction of total anomalous pulmonary venous drainage in infancy utilizing deep hypothermia with total circulatory arrest. Circulation, 35-36 (suppl.I) : 105-110, 1967.
- DUBOST, C. & BLONDEAU, P. - The Association of the Artificial Heart-Lung with Deep Hypothermia in Open Heart Surgery. J. Cardiovascular Surg., 1 : 85, 1960.
- DUNLOP, M. & CURNOW, D.H. - Transaminase levels in the normal dog, and the effect of profound hypothermia. Med J. Aust. 2: 292, 1962.
- ESCALDA, A.; CARVALHO, L.S.; CARVALHO, J.S.; CRUZ, J.M. - L'effet de l'hypothermie provoquée dans la circulation capillaire du foie. C.R. Soc. Biol. 179 : 801-804, 1985.
- ESCALDA, A.; ALVES, N.; ESCALDA, M.; CARVALHO, L.S.; LARANJEIRA L.; CARVALHO, J.S.; CRUZ, J.M. - Effect de l'hypothermie provoquée dans la circulation systémique. - C.R. Soc. Biol. 182 : 513-516, 1988.
- FALKMER, S. & KJELLGREN, J. - Morphologic and functional changes under Hypothermia. Acta Med Upsal., 60 : 199, 1955.

- FISHER, E.R.; FEDOR, E.J. & FISHER, B. - Pathologic and histochemical observations in experimental hypothermia. A.M.A. Arch. Surg., 75: 817-827, 1957.
- FUHRMAN, F.A.; CRISMON, J.M. - Relationship between tissue respiration and total metabolic rate in hypo and normothermic rats. Am. J. Physiol. 201 : 231, 1947.
- GAUTAM, H.P. - Jaundice following cardiopulmonary bypass. J. Cardiovasc. Surg., 10: 404-406, 1969.
- GOLLAN, F. - Extracorporeal cooling In: GOLLAN, F., ed. Physiology of Cardiac Surgery - Hypothermia. Extracorporeal Circulation and Extracorporeal Cooling. Springfield, Charles C. Thomas, 1959, pp.47-77.
- JOHANNESSEN, J.V. - Electron Microscopy in Human Medicine ed. McGRAW-HILL international Book Company (8) The Liver. The Gallbladder and Biliary Department of Pathology. The Norwegian Radium Hospital and Norsk Hydro's Institute of Cancer Research, Oslo Norway, 1979.
- KHEDROO, L.G.; CASELLA, P.A.; MALIT B., & UGAS, J. - Hepatic histochemical manifestations incident to canine extracorporeal circulation bypass and cardiectomy, J. Int. Col. Surg., 43 : 19-25, 1965.

- KINGSLEY, D.P.E. - Hepatic damage following profound hypothermia and extracorporeal circulation in man. Thorax, 21 : 91, 1966.
- KIRKLIN, J.W.; PACIFICO, A.D.; HANNAH III, H. & ALLARDE, R.R.
Primary definitive intracardiac operations in infants: intraoperative support techniques. In : KIRKLIN, J.W. ed Advances in Cardiovascular Surgery. New York, Grune & Stratton, 1973, pp. 85-99.
- KNOCKER, P. - Effects of experimental hypothermia in vital organs
Lancet, 2 : 837, 1955.
- LAMONT, J. & ISSELBACHER, K. Postoperative jaundice. In eds. WRIGHTR, R.; MILLWARD-SADLER, G.H.; ALBERTI, K.G.M.M. & KARRAN, S. Liver and biliary disease. Bailliere, Tindall, London 1367-1377, 1985.
- LAGUDIS, S.; MANSUR, A.J.; DAMIÃO, A.O.M.C.; FALZONI, R.; GRINBERG, M.; BELLOTTI, G. - Síndrome de icterícia pós-operatória após substituição valvar mitral, Relato de Caso. Arg. Bras. Cardiol., 54/6: 393-395, 1990.
- LARMI, T.K.I., & KARKOLA, P. - Liver dysfunction and enzymes during experimental long-term cardiopulmonary by-pass. J. Cardiovasc. Surg., 14: 395-403, 1973.

LARMI, T.K.I. - Jaundice following cardiopulmonary by-pass. An Chir. Gyn. Fen., 62: 2-8, 1973

LOCKEY, E.; MACINTERY, N.; ROSS, D.N.; BROOKS, E. & STURRIDGE, M.F.
- Early Jaundice after open heart surgery. Thorax, 22:
165-169, 1967.

MOHRI, H.; BARNES, R.W.; WINTERSCHIED, L.C.; DILLARD, D.H. & MEREN-
DINO, K.A. - Challenge of prolonged suspended animation: A
method of surface - induced deep hypothermia. Ann. Surg., 168:
779-787, 1968.

MOHRI, H. & MERENDINO, K.A. - Hipotermia con circulacion extracorporea o sin ella. In: GIBBON, J.H.; SABISTON, D.C.; SPENCER, F.C., ed. Cirurgia Toracia. Barcelona, Salvat Editores, S.A., 1971, pp 690-722.

MUNDTH, E.D.; KELLER, A.R., & AUSTEN, W.G. - Progressive hepatic and renal failure associated with low cardiac output following open heart surgery. J. Thorac Cardiovasc. Surg., 53, 275-284, 1967.

OLIVEIRA, R.A.; SILVA, M.A.M.; ANDRADE, R.R.; PINHO, S.Z.; CURI, P.R.; HOSSNE, W.S. - Alterações hemodinâmica Hepáticas (fluxometria e Manometria) durante circulação extracorpórea, em Condições de Normo e Hipotermia, com e sem hemodiluição. Estudo Experimental no cão. Arq. Bras. Cardiol. 44/5: 311-317, 1985.

- OLSON,R; HERMODSSON,S.; ROBERTS,D. & WALDENSTROM, J. - Hepatic dysfunction after open-heart surgery. SCAND J. THOR CARDIOVAS SURG 18: 217-222, 1984.
- PEREIRA,S.N.; MARCIAL,J. B.; COSTA, B. T.D.; SILVA, L.C.; VERGINELLI, G.; BITTENCOURT, D. & ZERBINI, E. J. - Alterações hepáticas em cirurgia cardíaca com circulação extracorpórea. Arg. Bras. Cardiol. 25 : 465-469, 1972.
- RITTENHOUSE, E.A.; MORHI, H.; DILLARD, D.H. & MERENDINO, K.A.. - Deep hypothermia in cardiovascular surgery. Ann. Thorac Surg. 17 63-98, 1974.
- ROBINSON, J. S.; COLE, F.R.; GIBSON, P. & SIMPSON, J.A. - Jaundice following cardiopulmonary bypass. Thorax, 22: 232-237, 1967.
- SANDERSON, R.G.; ELLISON, J.H.; BENSON,J.A. & STARR,A. - Jaundice following open-heart surgery. Ann.Surg., 165: 217-224, 1967.
- SARAJAS,H.S.S.; SENNING, A., & KAPLAN, J. - Heart damage in dogs subjected to hipothermia, circulatory arrest and cardiac surgery. Am. Heart J., 52: 836, 1956.
- SEARLY, W.C.; BROWN, I. W.; YOUNG. W.G.. - A report on the use of both extracorporeal circulation and hypotermia for open heart surgery. Ann Surg, 147: 603, 1958.

SING, H.M. & BAKER, J.T. - Jaundice following open-heart surgery.

Thorax, 29: 68-74, 1974.

SMITH, L.W.; SAND, M.E. - A Critical Histopathologic Study: Fifty Post-Mortem Patients with Cancer Subjected to Local or Generalized Refrigeration Compared to a Similar Control Group of 37 Nonrefrigerated Patients. J. Lab. & Clin. Med., 26: 443, 1940.

TALBOTT, J. H.; CONSOLAZIO, W.V., & PECORA, L.J. - Hypothermia: Report of a case in which the patient died during therapeutic reduction of body temperature, with metabolic and pathologic studies. Arch. Int. Med., 68: 1120, 1941.

TREDE, M.; FOOT, A.V. & MALONEY JR., J.V. - Pathophysiologic aspects of profound hypothermia with extracorporeal circulation. Ann. Surg., 154: 210-224, 1961.