

GRACINDA DE LOURDES JORGE

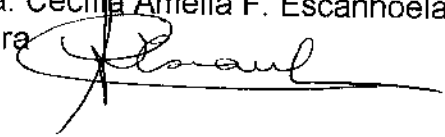
**NOVO MODELO EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÃO
BILIAR EM RATOS WISTAR.**

Campinas

2000 Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas, Área Ciências Biomédicas.

Campinas, 29 de agosto de 2000.

Profa. Dra. Cecília Amélia F. Escanhoela
Orientadora



GRACINDA DE LOURDES JORGE

**NOVO MODELO EXPERIMENTAL DE OBSTRUÇÃO
BILIAR EM RATOS WISTAR.**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

*Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas para obtenção
do título de Mestre em Ciências Médicas, na Área de
Ciências Biomédicas.*

Orientadora: Profa. Dra. Cecília Amelia Fazzio Escanhoela

Co-orientadora: Profa. Dra. Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin

Campinas

2000



200016398

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	5768n
V.	Ex.
TOMBO BC/	42951
PROC.	16-278100
C	☐
D	☒
PREC.	R\$ 41,00
DATA	25/06/00
N.º CPD	

CM-00147052-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

J768n Jorge, Gracinda de Lourdes
 Novo modelo experimental de obstrução biliar em ratos wistar /
 Gracinda de Lourdes Jorge. Campinas, SP : [s.n.], 2000.

 Orientadores : Cecilia Amelia Fazzio Escanhoela, Ilka de Fátima
 Santana Ferreira Boin
 Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
 Ciências Médicas.

 1. Icterícia . 2. Cirrose Hepática. 3. Trato biliar - Cirurgia. 4,
 Fígado. I. Cecilia Amelia Fazzio Escanhoela. II. Ilka de Fátima
 Santana Ferreira Boin. III. Universidade Estadual de Campinas.
 Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Profa. Dra. Cecilia Amelia Fazzio Escanhoela

Membros:

1. Prof. Dr. Orlando de Castro e Silva Jr. -

2. Profa. Dra. Celsiana A.M. Altomani -

3. Profa. Dra. Cecilia Amelia F. Escanhoela -

Curso de pós-graduação em Ciências Médicas, Área de Concentração em Ciências Biomédicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data:

29/08/00

*Ao Prof. Dr. Luiz Sérgio Leonardi, pela
inquietação contagiante que me levou a
desenvolver este trabalho...
e a mergulhar em mares nunca dantes navegados...*

Ao meu pai, Amadeu, pelo amor, carinho, mimo, paciência e dedicação.

*À minha mãe, Benedita, por sua força, pelo amor, e por ter me ensinado a superar os
inúmeros obstáculos.*

*Às minhas irmãs, Neuza e Cleuza, em especial, pelo amor, carinho, amizade e estímulo
constante em todos os momentos da minha vida.*

Aos meus irmãos, Heitor e Jorge , e irmãs, Maria e Egilda.

A todos os sobrinhos e cunhados, em especial ao Izael.

AGRADECIMENTOS

Todo e qualquer agradecimento que eu faça a estas pessoas será sempre pouco, perto do muito que eles sempre me ofereceram.

À Profª Drª. Cecília Amelia Fazzio Escanhoela pela atenção, orientação e responsabilidade com que conduziu todos os estágios desta pesquisa.

À Profª. Drª. Ilka de Fátima Santana Ferreira Boin pela assessoria e pelo apoio constante.

Ao Prof. Dr. Orlando de Castro e Silva Jr. pela preciosa contribuição, amizade e palavras de incentivo.

Ao Prof. Dr. Gottfried Köberle, com muito carinho, por ter me ensinado a caminhar, e me conduzido ao fascinante universo das Ciências Biológicas.

À Drª. Lúcia Silva Castanho Moraes, do Departamento de Patologia Clínica do Hospital das Clínicas da Unicamp, pela contribuição na avaliação bioquímica.

Ao biólogo Willian Adalberto Silva, do Laboratório de Técnica Cirúrgica do NMCE, pelo precioso auxílio na parte experimental, e pelas palavras de apoio e amizade.

Ao biólogo e desenhista Wenilton Luis Daltro pelo carinho e amizade e por ter me prestigiado com um toque de sua arte neste trabalho.

Às técnicas Gisele C. Ferreira e Luzia Reis, do Laboratório de Anatomia Patológica Experimental do NMCE, pelo auxílio na confecção das lâminas para avaliação histopatológica.

À secretária da pós-graduação, Maria do Carmo, pela atenção e apoio na parte burocrática.

Aos amigos e colegas de trabalho do NMCE pelo apoio e palavras de incentivo.

Às estatísticas Cleide Ap. Moreira Silva e Andréia Ferreira, do Setor de Estatística da Comissão de Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp

Ao Jorge Airton e Dr. Mauro pela ajuda nos mistérios da computação.

A Cayan de Souza pela valiosa contribuição com o “scanner” .

Ao Mano, de forma muito especial, pelo papel de ouvinte constante.

Aos amigos, presentes ou distantes, pela participação, incentivo, apoio, compreensão e paciência em especial: à Wlázia, à Leila, à Riva, ao Orlando e Tereza, à Wannyse, ao José Mario, à Roberta Priscila, ao Ilton, à Célia Regina, ao Fernando, à Suseley, à Celestina , à Vânia, à Dora.e à Jucelei.

Ao Sr. Milton Severino (in memmorian) pelo incentivo e patrocínio de meu curso de graduação.

À Diretoria de Apoio Didático, Científico e Computacional da Universidade Estadual de Campinas pelo auxílio na documentação fotográfica, editoração e preparação dos diapositivos.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
BT	bilirrubina total
BD	bilirrubina direta
BI	bilirrubina indireta
CEMIB	Centro de Bioterismo da UNICAMP
CO	controle
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DP	desvio padrão
FA	fosfatase alcalina
GGT	gama-glutamilttransferase
H-E	Hematoxilina-Eosina
NMCE	Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental
p	valor de significância estatística
PT	proteínas totais
ALB	albumina
U/l	unidade por litro
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
OB	obstrução biliar
OS	operação simulada
µm	micrômetro

LISTA DE TABELAS

	PÁG.
Tabela 1: Peso médio inicial e final dos animais do grupo OB, OS e CO.....	24
Tabela 2: Alterações histológicas semi-quantificadas observadas nos ratos submetidos à obstrução biliar.....	35

	PÁG.
RESUMO	<i>i</i>
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	12
2.1. Objetivo geral.....	13
2.2. Objetivos específicos.....	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1. Material.....	15
3.1.1. Animais utilizados.....	15
3.1.2. Formação dos grupos de animais.....	15
3.2. Métodos.....	16
3.2.1. Descrição do experimento.....	16
3.2.1.1. Anestesia e procedimentos operatórios.....	16
3.2.1.2. Obstrução do ducto hepático.....	17
3.2.1.3. Cuidados pós-operatórios.....	19
3.2.2. Avaliação clínica antes do sacrifício.....	19
3.2.3. Avaliação macroscópica da cavidade abdominal.....	20
3.2.4. Coleta de material.....	20
3.2.5. Avaliação bioquímica do sangue.....	21
3.2.6. Análise histológica do fígado.....	21
3.3. Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS	23
4.1. Evolução dos animais nos diversos grupos.....	24

4.2. Avaliação pós-operatória.....	24
4.3. Análise macroscópica da cavidade abdominal.....	25
4.4. Avaliação bioquímica do sangue.....	26
4.4.1. Alanina aminotransferase.....	26
4.4.2. Aspartato aminotransferase.....	27
4.4.3. Gama-glutamilttransferase.....	28
4.4.4. Fosfatase alcalina.....	29
4.4.5. Proteínas totais.....	30
4.4.6. Albumina.....	31
4.4.7. Bilirrubina total.....	32
4.4.8. Bilirrubina direta.....	33
4.4.9. Bilirrubina indireta.....	34
4.5. Análise histológica do fígado.....	35
4.5.1. Fibrose portal.....	36
4.5.2. Septos fibrosos.....	38
4.5.3. Proliferação de ductos biliares.....	40
4.5.4. presença de nódulos regenerativos.....	42
4.5.5. Colangite.....	44
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÕES.....	60
7. SUMMARY.....	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
9. ANEXOS.....	76

LISTA DE FIGURAS

	PÁG.
Figura 1: Ducto hepático sendo isolado após sua emergência do pâncreas.....	18
Figura 2: Exposição do apêndice xifóide.....	18
Figura 3: Com o auxílio de pinça hemostática de microcirurgia passada através desse orifício, fez-se a captura do fio de prolene nº 4-0, trazendo consigo o ducto hepático.....	18
Figura 4: Com o auxílio de pinça hemostática de microcirurgia passada através desse orifício, fez-se a captura do fio de prolene nº 4-0, trazendo consigo o ducto hepático.....	18
Figura 5: Alça de ducto biliar foi exposta através do orifício no apêndice xifóide. O cateter levine nº 8 foi então introduzido sob esta.....	19
Figura 6: Fechamento da parede muscular com fio de poli-propileno nº 4-0 (sutura contínua), deixando-se o ducto biliar exposto sobre a musculatura, sob o cateter de levine.....	19
Figura 7: Ducto hepático intensamente dilatado(seta).....	25
Figura 8: Representação dos valores séricos da ALT (U/l) entre os ratos submetidos à operação simulada (grupo OS) e ratos com obstrução biliar (grupo OB) ($p=0,0001$).....	26
Figura 9: Representação dos valores séricos da AST (U/l) entre os ratos submetidos à operação simulada (grupo OS) e ratos com obstrução biliar (grupo OB) ($p=0,0001$).....	27
Figura 10: Representação dos valores séricos da GGT (U/l) entre os ratos submetidos à operação simulada (grupo OS) e ratos com obstrução biliar (grupo OB) ($p=0,0004$).....	28

Figura 11:	Representação dos valores séricos da FA (U/l) entre os ratos submetidos à operação simulada (grupo OS) e ratos com obstrução biliar (grupo OB) ($p=0,0001$).....	29
Figura 12:	Representação dos valores séricos das proteínas totais entre ratos submetidos à operação simulada (grupo OS) e ratos com obstrução biliar (grupo OB) ($p=0,5352$).....	30
Figura 13:	Representação dos valores séricos de albumina (g/dl) entre os ratos submetidos à operação simulada (grupo OS) e ratos com obstrução biliar (grupo OB) ($p=0,0001$).....	31
Figura 14:	Representação dos valores séricos de BT entre os ratos submetidos à operação simulada (grupo OS) e ratos com obstrução biliar (grupo OB) ($p=0,0001$).....	32
Figura 15:	Representação dos valores séricos de BD entre os ratos submetidos à operação simulada (grupo OS) e ratos com obstrução biliar (grupo OB) ($p=0,0010$).....	33
Figura 16:	Representação dos valores séricos de BI entre os ratos submetidos à operação simulada (grupo OS) e ratos com obstrução biliar (grupo OB) ($p=0,0010$).....	34
Figura 17:	Gráfico representativo dos valores percentuais de fibrose portal observada nos casos do grupo OB.....	36
Figura 18:	Fibrose portal leve (H-E. 200X).....	37
Figura 19:	Fibrose portal leve (tricrômio de Masson - 200X):	37
Figura 20:	Gráfico representativo dos valores percentuais de septos fibrosos presentes nos casos do grupo OB.....	38
Figura 21:	Moderada proliferação de septos fibrosos de localização porta-porta e porta-centro (tricrômio de Masson - 40X).....	39

Figura 22:	Gráfico representativo dos valores percentuais de proliferação de ductos biliares observada nos caso do grupo OB.....	40
Figura 23:	Intensa proliferação ductular portal e septal, (tricroômio de Masson - 200X).....	41
Figura 24:	Gráfico representativo dos valores percentuais dos nódulos regenerativos presentes nos casos do grupo OB%.....	42
Figura 25:	Notar um nódulo regenerativo totalmente envolto por septos fibrosos, na espessura dos quais há moderada proliferação ductular. (tricroômio de Masson - 100X).....	43
Figura 26	Gráfico representativo dos valores percentuais de colangite presentes nos casos do grupo OB.....	44

RESUMO

Este experimento teve por objetivo o desenvolvimento de um modelo de obstrução biliar, através de procedimento cirúrgico sem ligadura, canulização ou secção do ducto biliar, que permitisse evolução para cronificação, com o desenvolvimento de cirrose biliar (ou ao menos “fibrose de padrão biliar”) e mantivesse a via biliar extra-hepática facilmente acessível a eventuais manuseios. A avaliação histopatológica do fígado destes animais e os efeitos bioquímicos séricos foram realizados após 30 dias da obstrução.

Inicialmente foram utilizados 63 ratos Wistar, distribuídos em três grupos: 47 animais foram submetidos à obstrução do ducto hepático comum (grupo OB), 9 foram submetidos à operação simulada (grupo OS) e 7 foram adotados como controle para análise histológica (grupo CO).

No desenvolvimento da técnica, o ducto hepático foi isolado logo após sua emergência justa-pancreática, deixando-se 1 cm de ducto livre, reparado com fio de polipropileno. Em seguida procedeu-se à exposição do apêndice xifóide e, através de marcador de orelha de rato, foi feito aí um pequeno orifício, pelo qual passou-se o fio tracionando o ducto biliar. Deste modo formou-se uma alça de ducto biliar emergindo pelo orifício do apêndice xifóide; um cateter de silicone foi colocado sob esta alça. O ducto biliar permaneceu, portanto, tracionado e exposto entre a musculatura e a pele. O fechamento da parede muscular e da pele foi feito com sutura contínua.

Quinze ratos (32%) do grupo OB foram eliminados do estudo por óbito precoce (8 casos) ou falha técnica (7 casos). Para os demais 32 animais do grupo OB foi demonstrado aumento significativo nas dosagens séricas de bilirrubina, aminotransferases (ALT e AST), fosfatase alcalina e gama-glutamilttransferase, com redução da albumina, quando comparados aos valores das dosagens dos ratos do grupo OS. A análise histológica confirmou o desenvolvimento de “fibrose de padrão biliar” em todos os casos do grupo OB, com formação de nódulos regenerativos em 68,7%. Esta se caracterizou por fibrose portal (de grau leve e moderado) em 96,9% dos animais, com formação de septos fibrosos (de grau moderado e intenso) em 87,4 % e proliferação de ductos biliares em todos os casos (intensa em 81,3% e moderada em 18,7%).

Conseguimos desta maneira, o desenvolvimento de um modelo experimental alternativo simples e eficaz. Devido à facilidade de manuseio, a obstrução provocada pela tração do ducto biliar oferece excelentes condições de pesquisa desde o momento da interrupção do fluxo biliar, até o desenvolvimento de colestase acompanhada por distorção da arquitetura hepática, com possibilidade ainda de reversão do quadro obstrutivo em qualquer fase evolutiva do processo.

1. INTRODUÇÃO

Por definição, obstrução biliar extra-hepática é aquela decorrente de processo obstrutivo em qualquer nível da árvore biliar, a partir da bifurcação do ducto hepático comum ("porta hepatis") até a papila de Vater (SHERLOCK, 1975; COTRAN, KOMAR, ROBBINS, 1991).

No recém-nascido, a causa mais comum de colestase obstrutiva é a atresia das vias biliares extra-hepáticas. Esta corresponde a 5% dos casos de colestase prolongada do neo-nato e sua etiologia continua não totalmente esclarecida, aceitando-se mais a causa infecciosa. No adulto, esta pode ser devida a lesões expansivas extrínsecas, como por exemplo: tumores da cabeça do pâncreas, da região peri-ampular das vias biliares extra-hepáticas, obstruções por cálculos biliares, secundária a processos iatrogênicos cirúrgicos estenosantes progressivos, ou ainda devida a causas mais raras, tais como divertículo de colédoco, aneurisma da artéria hepática ou gastroduodenal, cisto renal, úlcera ou divertículo duodenal (SHERLOCK, 1975).

Como consequência há o aparecimento de colestase, que representa somente um distúrbio no fluxo biliar, não acompanhada, inicialmente, por alterações nos mecanismos secretórios hepatocitários.

Inicialmente a via biliar extra-hepática sofre distensão pela presença da bile e quando a obstrução é prolongada, esta pode aumentar em até 10 vezes o seu diâmetro. Posteriormente, temos uma extensão retrógrada progressiva da estase biliar para dentro do sistema de ductos intra-hepáticos, desencadeando-se uma sequência de fenômenos colestáticos.

De maneira geral, o processo biliar obstrutivo mantido leva ao aparecimento das seguintes alterações morfológicas (em ordem cronológica) no parênquima hepático (ESCANHOELA & VALENÇA JR., 1998):

- Bilirrubinostase, que é a retenção de grânulos biliares finos no interior de hepatócitos, podendo já ser observada poucos dias após o início da obstrução. Quando esta é muito recente será observada somente na zona 3 acinar, já que a drenagem da bile através da árvore biliar intra-hepática se faz da zona 3 para a zona 1 acinar.

- Reação biliar portal, caracterizada inicialmente por edema e infiltrado inflamatório misto (linfomononuclear e neutrofilico), seguida pela proliferação marginal (junto à placa limitante) de ductulos biliares praticamente sem luz.

- Bilirrubinostase mais evidente, com presença de grânulos biliares intracitoplasmáticos mais grosseiros.

- “Rosetas colestáticas”: dilatação dos espaços intercelulares com ou sem hepatócitos dispostos ao seu redor e de canaliculos biliares, com o aparecimento de rolhas biliares em pleno lóbulo.

- Expansão da bilirrubinostase e das rolhas biliares através das zonas 2 e 1 acinares, por vezes tocando o espaço-porta.

- Colestase de longa duração acaba levando ao aparecimento da degeneração plumosa de hepatócitos (“feathery degeneration”), acompanhada inicialmente por necrose hepatocelular focal (corpúsculos acidófilos), secundária à própria degeneração plumosa ou à compressão trabecular pela dilatação canalicular, resultando em necrose lítica, com o aparecimento de células macrofágicas e leucócitos neutrófilos no local.

- Colatestase é a presença de hepatócitos com o citoplasma vacuolado e de aspecto reticulado na zona 1 acinar, que corresponde à lesão menos severa que a degeneração plumosa. Necroses mais extensas de localização peri-portal levam ao aparecimento de infartos biliares amplos .

- Necrose biliar em saca-bocados, é o quadro morfológico que se desenha na interface lobular-portal, caracterizada então pela proliferação ductular marginal, acompanhada pelo infiltrado inflamatório, colatestase e necrose hepatocelular peri-portal.

- A necrose de hepatócitos geralmente leva à ruptura de canaliculos biliares, com extravasamento de pigmento biliar no lóbulo e afluxo de células macrofágicas, as quais tendem a ter o citoplasma amplo e xantomatoso. Ao extravasamento de pigmento biliar em grande volume, dá-se o nome de lago biliar.

- Alargamento portal, com o aparecimento de fibrose e concomitância da proliferação ductular, com ductulos progressivamente maiores e agora com luz central presente. Eventualmente serão observados ainda rolhas biliares no interior de colangíolos e de ductos biliares interlobulares.

- O único dado morfológico patognomônico de obstrução biliar extrínseca seria a reação macrofágica portal (incluindo células gigantes multi-nucleadas) decorrente da ruptura de ductos biliares, com extravasamento de pigmento biliar no espaço-porta. Infelizmente este fenômeno é muito pouco observado.

- A fibrose portal pode ter por vezes arranjo concêntrico peri-ductal, levando a alterações do fluxo sangüíneo do plexo capilar, com alterações degenerativas e atróficas do epitélio ductal, podendo chegar ao grau extremo de desaparecimento ductal.

- Um fator complicador na evolução do processo é o surgimento de colangite, somente diagnosticada quando da presença de leucócitos neutrófilos permeando a parede do ducto biliar, visto que o refluxo bíleo-linfático, causado pela própria obstrução, leva ao aparecimento de leucócitos neutrófilos no espaço-porta, fazendo parte do processo inflamatório, sem constituir verdadeira inflamação ductal.

- Emissão de septos fibrosos inicialmente curtos para o lóbulo, acompanhando o processo de proliferação ductular marginal.

- Cicatrização lobular, com presença de fibrose envolvendo células isoladas ou agrupamentos celulares.

- Anastomoses fibrosas, com o aparecimento de septos porta-porta ou porta-centro, os quais passam a envolver nódulos.

- Cirrose biliar secundária: esta é pouco freqüente nos processos obstrutivos. GIBSON & ROBERTSON (1939) estudaram 244 casos de necrópsia por obstrução biliar, e a cirrose biliar verdadeira, definida como degeneração parenquimatosa, fibrose e regeneração nodular, esteve presente em apenas 21 casos (8,6 %).

O intervalo de tempo entre o início da obstrução biliar e o aparecimento da cirrose varia amplamente (SCOBIE & SUMERSKILL, 1965), sendo a duração da obstrução, fator importante no desenvolvimento da fibrose e cirrose biliar. Os estudos de microscopia

óptica do fígado de pacientes com obstrução biliar mostraram proliferação de fibroblastos já com 7 dias de obstrução, e o aparecimento de regeneração nodular somente após 212 dias do início da icterícia.

As alterações clínicas que surgem tardiamente na obstrução biliar são comumente atribuídas à cirrose biliar secundária (ADSON & WYCHULIS, 1968; COLE, IRENEUS, REYNOLDS, 1995; SEDGWICK, POULANTZAS, KUNE, 1996), sendo seus principais indicadores a esplenomegalia e ascite associadas à hepatomegalia (SCOBIE & SUMERSKILL, 1965). Num estudo com 160 pacientes com cirrose biliar secundária, 37 (23%) apresentavam também varizes de esôfago (ADSON & WYCHULIS, 1968).

A alteração laboratorial mais precocemente observada em pacientes portadores de obstrução biliar extrínseca é a hiperbilirrubinemia. As demais alterações laboratoriais são variáveis de acordo com o grau de lesão hepatocelular, que ocorre secundariamente. LEEVY, DVORSCHAK, GNASSI (1954), num estudo compreendendo 60 pacientes portadores de obstrução biliar, encontraram alterações bioquímicas semelhantes em 75% dos casos. O aumento da fosfatase alcalina e a hiperbilirrubinemia foram observados em quase todos os casos, com poucas exceções. Os níveis séricos das aminotransferases não tiveram importância para o diagnóstico. As alterações nas proteínas séricas, quando presentes, compreenderam a hipoalbuminemia e a hipergamaglobulinemia, refletindo a presença de lesão no parênquima hepático.

Além de eventual evolução para fibrose e cirrose biliar, a obstrução biliar prolongada pode gerar dois problemas mecânicos importantes: Primeiro, substâncias excretadas pelo fígado não chegam ao duodeno. Segundo, a elevação da pressão nos ductos biliares impede a excreção da bile e facilita o seu refluxo para o sangue. Assim, as bilirrubinas diretas e total, a fosfatase alcalina, ácidos biliares e a gama-glutamilttransferase estão acumuladas no plasma e o urobilinogênio urinário e fecal estão diminuídos ou ausentes (LEE, 1994; SCOTT-CONNER & GROGAN, 1994).

De acordo com VITAL *et al.* (1982), além do esperado aumento das bilirrubinas séricas na icterícia obstrutiva, o aumento dos níveis séricos e teciduais hepáticos de sais biliares indicam lesão hepatocelular.

Após a drenagem da via biliar nos pacientes portadores da cirrose biliar secundária, ocorre desaparecimento das anormalidades clínicas e bioquímicas, mas ocorre insuficiência hepática progressiva, com evolução fatal no período de 1 a 4 anos em todos os pacientes (LEEVY *et al.*, 1954).

A deterioração da função hepática leva ao óbito por falência hepatocelular, sangramento digestivo e/ou septicemia (WAY, BERNHOFT, THOMAS, 1981).

A cirrose é freqüentemente considerada como estágio final da lesão hepática e como situação irreversível (PEREZ-TAMAYO, 1979), sendo que a raridade de documentação de reversão da cirrose biliar, dá suporte a este conceito. No entanto, há relatos de casos em que a descompressão biliar eficaz promoveu reversão das alterações histológicas e da hipertensão portal, como a relatada por BUNTON & CAMERON (1963), com reversão da cirrose biliar secundária em criança de dois meses, portadora de atresia das vias biliares extra-hepáticas.

OBSTRUÇÃO BILIAR EXPERIMENTAL

A interrupção experimental do fluxo biliar do fígado para o duodeno pode induzir à fibrose e à cirrose biliar. Os métodos empregados produzem alterações morfológicas e funcionais diversas e variáveis, sendo vários os modelos de indução experimental empregados.

O desenvolvimento, a gravidade e a extensão das alterações, tanto morfológicas como funcionais, dependem da espécie animal, do grau, da duração, do local e do método empregados para a obstrução biliar (CAMERON & OAKLEY, 1932)*. O peso e a idade dos

* CAMERON, G. R & OALEY, C.L., apud: KOUNTOURAS, J.; BILLING, B.H.; SCHEUER, P.J. - Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. *Br. J. Exp. Pathol.*, 65:305-11, 1984.

animais por ocasião da obstrução biliar, também podem influenciar na evolução do quadro (MEDEIROS, FREITAS, ANDRADE, 1988; ZIMMERMANN *et al.*, 1992), bem como seu estado nutricional evolutivo. TRAMS & SYMEONIDIS (1957) observaram que os ratos submetidos à obstrução biliar, apresentaram anorexia após uma semana do início do estudo.

Várias espécies de animais foram utilizadas para estudo de indução de cirrose biliar. Atualmente, o rato e o cão são os animais mais empregados e os resultados são heterogêneos.

Em ratos, os efeitos da ligadura convencional do ducto biliar na morfologia hepática têm sido examinados exaustivamente há mais de 50 anos, desde a publicação de CAMERON & OAKLEY (1932 apud KOUNTOURAS *et al.*, 1984). Estes autores descreveram que ao redor da terceira semana pós ligadura dupla do ducto biliar ocorre dilatação sacular da porção proximal do ducto hepático e o fígado sofre uma desorganização, com o aparecimento de nódulos de regeneração e atrofia celular, com presença de bandas de fibrose discreta e ductos biliares proliferados. O quadro seria o de cirrose biliar estabelecida.

Em trabalho posterior, avaliando cronologicamente as alterações estruturais e funcionais do fígado após ligadura biliar, CAMERON & HASAN (1958) relataram, após 5 a 7 semanas de obstrução, desorganização da arquitetura hepática e complicações como infecção, infarto extenso e trombose portal. Observaram, nessa fase, discreta supuração difusa, acompanhada por fibrose. A correlação entre as alterações estruturais e os testes bioquímicos não foram bem estabelecidos. Os valores séricos da bilirrubina não foram muito elevados (4,8 mg %, em média), e foram menores que os obtidos com uma semana de obstrução (10,5 mg %, em média). Houve discreto aumento da fosfatase alcalina e não ocorreu alteração na relação albumina/globulina. Após 9 a 11 semanas de obstrução biliar, foram observados sinais histológicos de infecção e a cirrose verdadeira se instalou. Manteve-se a elevação das bilirrubinas séricas e fosfatase alcalina e ocorreu inversão na relação albumina/globulina.

Acompanharam ainda a evolução de três ratos que apresentaram icterícia e que sobreviveram após a fase em que normalmente ocorre a cirrose biliar secundária, sendo dois deles sacrificados no 8º mês após a obstrução. Apesar do alargamento causado pela fibrose e proliferação de ductos biliares, o parênquima hepático apresentou arquitetura normal. O outro animal, sacrificado após 1 ano de obstrução, mostrou a arquitetura hepática normal. As avaliações funcional e bioquímica do fígado também foram normais e constatou-se a restauração espontânea do fluxo biliar decorrente da reabsorção do fio cirúrgico utilizado para a obstrução.

TRAMS & SYMEONIDIS (1957) demonstraram que após ligadura única do ducto hepático, o restabelecimento do fluxo hepático biliar ocorreu em poucas semanas.

Com o objetivo de avaliar a recuperação hepática após a obstrução biliar, CAMERON & PRASAD (1960) utilizaram esta técnica e observaram que a obstrução permanecia por 4 semanas, sendo freqüentemente seguida da restauração espontânea do fluxo biliar. Nas 4 semanas que se seguiam à obstrução biliar, havia proliferação ductal, fibrose, estase biliar acentuada, infiltração dos espaços-porta por linfócitos e monócitos e formação de micro-abscessos. Do 35º ao 49º dia, havia combinação de alterações, conferindo um aspecto de “cirrose atenuada”, caracterizada por alargamento dos espaços porta, com proliferação de ductos biliares, fibrose, estase biliar e nódulos de regeneração hepatocelular. Todos os animais observados após 7 semanas tiveram o fluxo biliar restabelecido, e o aspecto histológico do fígado estava próximo da normalidade.

KOUNTOURAS *et al.* (1984), visando estudar as alterações funcionais e morfológicas do fígado de ratos, promoveram a obstrução do ducto biliar com ligadura dupla, isoladamente ou associada à canulização mediante uso de prótese. Nos grupos de animais obstruídos, notaram elevação da concentração de bilirrubina sérica, com tendência à estabilização entre o 10º e 15º dias após a obstrução, com decréscimo a seguir. Após mais de 30 dias de obstrução, a média da concentração da bilirrubina conjugada foi de $114 \pm 18,5$ $\mu\text{mol/l}$ para o grupo obstruído com prótese, e de $99 \pm 18,6$ $\mu\text{mol/l}$, para o grupo obstruído por ligadura, não havendo diferença significativa.

Morfologicamente, KOUNTOURAS *et al.* (1984) observaram que após 5 dias de obstrução, em ambos os grupos, havia proliferação dos ductos biliares, com discreto infiltrado de neutrófilos ao redor destes. No parênquima havia inúmeros hepatócitos em fase mitótica e focos de necrose. Apesar disso, a arquitetura hepática estava normal. Após 10 dias de obstrução biliar, os espaços porta se expandiram pelo aumento da fibrose e proliferação ductal, formando septos fibrosos porta-porta. A proliferação ductal estendeu-se através dos espaços porta e invadiu o parênquima hepático. Infartos biliares foram ocasionalmente notados, principalmente nas áreas peri-portais, caracterizados por necrose de hepatócitos e acúmulo de fibrina. Após 15 dias, observaram que havia fusão dos septos fibrosos, com união dos espaços porta entre si e avanço da fibrose para os lóbulos, com alteração da organização lobular habitual e aparecimento dos nódulos de regeneração, indicativos de cirrose. Ocasionalmente, trombos organizados foram vistos nos ramos da veia porta. Todos os animais com mais de 30 dias de obstrução tinham cirrose, hipertensão portal (caracterizada pela esplenomegalia), e sinais de descompensação hepática, pela presença de ascite. A julgar pela presença da infiltração leucocitária discreta, os autores afirmaram que a colangite observada foi mínima.

GOLDMAN, STEER, SILEN (1983) sugerem que o aparecimento de colangite nos animais em que a anastomose se mantém ampla e p rvia, possa ser explicado por um mecanismo de obstrução transitória da anastomose, decorrente da presença de resíduos alimentares.

Os achados de proliferação ductal na região marginal do espaço porta, edema, infiltração leucocit ria e fibrose também foram observados por POULSEN & CHRISTOFFERSEN (1970), na análise dos sinais característicos da obstrução biliar em fígado humano, com colestase de duração de 1 a 5 semanas.

CAMERON & HASAN (1958); CAMERON & PRASAD (1960) e KOUNTOURAS *et al.* (1984), em seus experimentos, mostraram o desenvolvimento da cirrose secundária após 3 a 8 semanas de obstrução biliar. Outros autores (GROSS JR. *et al.*, 1987 e BACQ *et al.*, 1990) também atingiram o estágio de cirrose biliar mediante obstrução biliar, com a finalidade de estudar seus aspectos funcionais. No entanto, num período de

observação que durou 14 a 40 dias, FRANCO *et al.* (1979), JOHNSTONE & LEE (1976), McDONALD & PECHET (1961) e ZIMMERMANN *et al.* (1992) obtiveram um estágio de desorganização hepática, ao qual denominaram fibrose biliar secundária.

Na avaliação da regeneração celular, nesse processo, após a obstrução biliar, McDONALD & PECHET (1961) se utilizaram de timidina tritiada e auto-radiografia para detectar a síntese de ácido desoxirribonucleico. Observaram que os fibroblastos adjacentes aos ductos biliares foram as primeiras células a exibirem atividade proliferativa, seguidos pelas células ductais e hepatócitos, a partir do segundo dia de obstrução. Essa atividade regenerativa persistiu enquanto durou a obstrução biliar (34 dias) e reduziu-se com o restabelecimento do fluxo biliar. Na verificação da infecção, utilizaram a técnica de avaliação bacteriológica quantitativa, para distinguir infecção prévia de contaminação. Escherichia coli e Proteus sp foram injetados na veia de ratos com obstrução biliar e ratos controles. Demonstrou-se que a resposta proliferativa dos fibroblastos, células ductais e hepatócitos e o desenvolvimento da fibrose foram independentes da infecção.

JOHNSTONE & LEE (1976) promoveram obstrução biliar com ligadura dupla, para análise quantitativa e qualitativa das lesões hepáticas nos animais sacrificados com tempo de obstrução que variou entre 29 e 40 dias. As alterações histológicas foram variáveis. Num extremo houve proliferação ductal predominantemente interlobular e preserva o parênquima hepático. No outro extremo a proliferação ductal ocorreu ao acaso, difundindo-se entre os lóbulos, e os hepatócitos estavam separados em pequenas ilhas. Não houve cirrose biliar, já que não foram visualizados nódulos de regeneração e a fibrose, que mantém íntima relação com a proliferação ductal, não foi excessiva. A colangite foi mínima, a julgar pela infiltração neutrofílica discreta nos espaços porta.

ZIMMERMANN *et al.* (1992), ligando o ducto biliar com duas ligaduras proximais e outra distal, com remoção do coto ductal, obtiveram um quadro histológico de fibrose biliar secundária após 4 semanas de observação, acompanhado de hipertensão portal, avaliada pela pressão na polpa esplênica e peso do baço.

UNICAMP

BIBLIOTECA CENTRAL

SEÇÃO CIRCULANTE

No cão, a ligadura ductal deve ser feita distalmente ao último ducto lobar, próximo ao duodeno e seguida de colecistectomia (BOSCH *et al.*, 1983; WRIGHT & BRAITHWAITE, 1962). A lesão ductal pode provocar fistulas biliares e peritonite que, juntamente com a colangite e o sangramento, foram complicações relatadas por CAMERON & HASAN (1958) e se constituem nas causas mais comuns de morte nas duas primeiras semanas de obstrução biliar.

De maneira geral, muitos são os métodos normalmente empregados para a obtenção de obstrução biliar em animais de laboratório, tais como: ligadura simples do ducto biliar (KOCK-WESER *et al.*, 1952; TRAMS & SYMEONIDIS *et al.*, 1957), ligadura dupla e canulização do ducto biliar (ACCATINO *et al.*, 1979; KOUNTOURAS *et al.*, 1984; MELZER *et al.*, 1992), ligadura apoiada em prótese, ligadura e enovelamento contínuo do ducto biliar (CASTRO E SILVA JR. & MAZZETO, 1991; SANTOS *et al.*, 1998), ligadura dupla e transecção do ducto biliar (TRAMS & SYMEONIDIS *et al.*, 1957; ZIMMERMANN *et al.*, 1992). No entanto, nenhuma destas técnicas permite que a via biliar permaneça exposta ou seja de fácil acesso, visando-se um rápido procedimento subsequente, tal como interrupção precoce do quadro obstrutivo ou injeção de contraste, entre outros.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um modelo experimental que cause obstrução biliar no rato, levando-o ao quadro de fibrose (ou cirrose) biliar secundária e que possibilite a interrupção desta obstrução, em vários estadios evolutivos da doença.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar os efeitos bioquímicos séricos

Avaliar os efeitos histopatológicos no fígado destes animais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

CONSIDERAÇÕES GERAIS

As intervenções cirúrgicas foram realizadas no Laboratório de Transplante Hepático e os exames histopatológicos no Laboratório de Anatomia Patológica, ambos do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP); os exames bioquímicos foram realizados no Laboratório de Emergência do HC da UNICAMP. O estudo foi conduzido de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1991), baseadas nos princípios éticos de Experimentação Animal e o tempo estipulado de experimentação foi de 30 dias.

3.1. MATERIAL

3.1.1. Animais utilizados

Foram utilizados 63 ratos adultos (com idade de 12 semanas), machos e sadios, com peso inicial variando de 256 a 340 g (média de 303 g), da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*, rodentia, mammalia).

Os animais foram fornecidos pelo CEMIB (Centro de Bioterismo da UNICAMP), tendo sido mantidos em temperatura ambiente, em ciclos diurnos de luz, recebendo alimentação e água “ad libitum” até o dia do sacrifício.

3.1.2. Formação dos grupos de animais

GRUPO OBSTRUÇÃO BILIAR (OB) – Inicialmente, 47 animais foram submetidos à obstrução do ducto hepático. Estes foram mantidos em suas respectivas gaiolas com dieta livre, conforme rotina do biotério, e avaliados constantemente pelo mesmo pesquisador. Foram eliminados do estudo os que obituaram antes de se completar os 30 de experimentação. A coleta de amostras do fígado para avaliação histológica foi efetuada nos ratos na 30º dia após a cirurgia.

A coleta de sangue para a realização de exames bioquímicos foi realizada em 17 destes animais.

GRUPO OPERAÇÃO SIMULADA (OS) – Nove animais foram submetidos à operação simulada para controle da indução da obstrução biliar. Após 30 dias, imediatamente antes do sacrifício, fez-se coletas de amostra hepática para avaliação histológica e de sangue para dosagens dos exames bioquímicos.

GRUPO CONTROLE (CO) - Sete animais foram utilizados como controle, não tendo sido submetidos a nenhum ato cirúrgico. Foram mantidos nas mesmas condições dos outros grupos e observados pelo mesmo período de 30 dias. Em todos os ratos, imediatamente antes do sacrifício, fez-se a coleta de amostras do fígado para avaliação histopatológica.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Descrição do experimento

3.2.1.1. Anestesia e procedimentos operatórios

Os animais foram colocados em gaiolas próprias, devidamente identificadas, contendo no máximo cinco animais em cada. Foram mantidos no biotério do NMCE e, antes de cada procedimento, foram submetidos a jejum de ração por aproximadamente 8 h; foram pesados em balança elétrica (marca Marte CS 500) a seguir anestesiados por via inalatória com éter dietílico. Durante todo o ato cirúrgico o animal foi mantido anestesiado com ventilação espontânea, mediante inalação contínua de éter dietílico embebido em chumaço pequeno de algodão, localizado no interior de frasco de acrílico.

A imobilização do animal (em decúbito dorsal) foi feita em prancha cirúrgica apropriada, e a fixação de seus membros, com fita de esparadrapo. Foi realizada tricotomia da parede abdominal anterior e antisepsia da pele da região com solução iodo polivípirrolidona 2% (Indústria Brasileira- Rio de Janeiro, RJ).

3.2.1.2. Obstrução do ducto hepático

Foi realizada laparotomia por incisão mediana de 1,5 cm de extensão, a partir do apêndice xifóide. Afastou-se a borda inferior do fígado e, com o auxílio de haste flexível de algodão e gaze umedecida em solução de cloreto de sódio 0,9 %, apresentou-se a alça duodenal, para se expor o pedículo hepático.

O ducto biliar foi dissecado a partir de 1 cm acima da junção bileo-pancreática, até próximo à sua bifurcação, tomando-se o cuidado de não se lesar o ducto pancreático e os ramos da veia porta.

O ducto hepático foi isolado na emergência justa-pancreática, deixando-se aproximadamente 1 cm de ducto livre, reparado com fio de polipropileno nº 4-0 (Figura 1).

Em seguida procedeu-se à exposição do apêndice xifóide (Figura 2), no qual fez-se pequeno orifício com marcador de orelha de rato. Passou-se uma pinça hemostática de microcirurgia através deste orifício, onde se fez a captura do fio de polipropileno nº 4-0 e do ducto hepático (Figuras 3 e 4).

Após a exposição do ducto biliar através do orifício do apêndice xifóide (Figura 5), introduziu-se sob esta alça de ducto biliar formada, um catéter levine siliconizado nº 8, seccionado numa extensão de 1,5cm, que foi fixado sobre o apêndice xifóide, mantendo-se o ducto biliar tracionado.

O fechamento da parede muscular foi feito com fio de polipropileno nº 4-0 em sutura contínua, deixando o ducto biliar sob o cateter de levine exposto sobre a musculatura (Figura 6). A pele foi fechada por sutura contínua com fio de algodão nº3-0. O tempo do procedimento cirúrgico foi anotado em minutos.

Nos animais do grupo OS o ducto hepático foi dissecado com todos os procedimentos e cuidados utilizados para o grupo OB, porém não foi reparado e/ou fixado com o cateter.

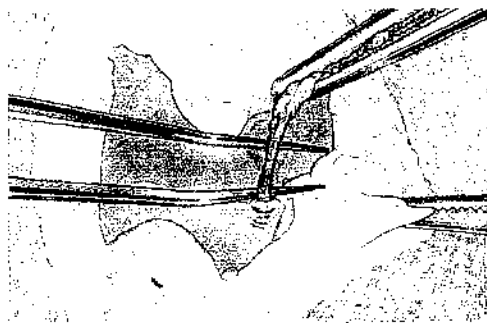


Figura 1

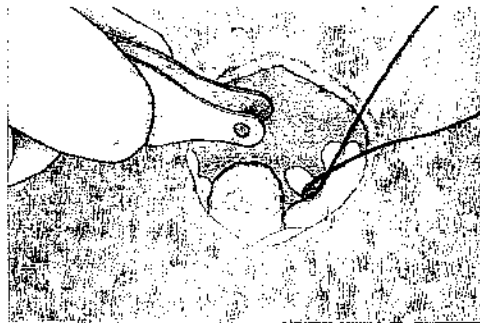


Figura 2

Legenda da Figura 1: Ducto hepático sendo isolado após sua emergência do pâncreas.

Legenda da Figura 2: Exposição do apêndice xifóide (Notar, acima, marcador de orelha de rato).

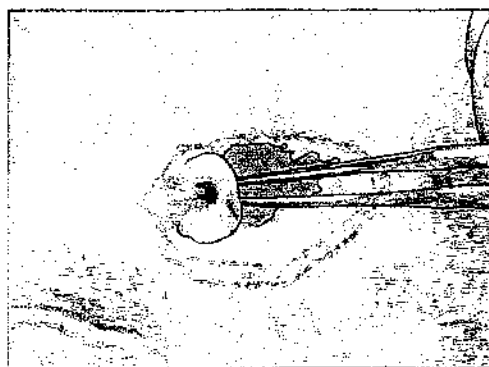


Figura 3

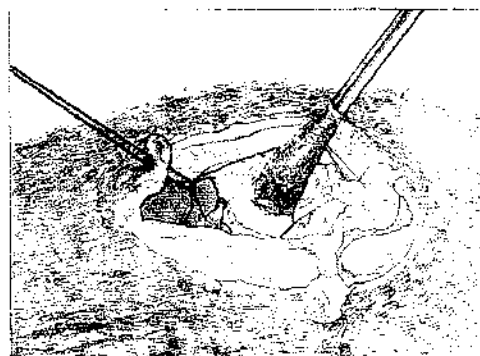


Figura 4

Legenda das Figuras 3 e 4: Com o auxílio de pinça hemostática de microcirurgia passada através desse orifício, fez-se a captura do fio de prolene nº 4-0, trazendo consigo o ducto hepático.

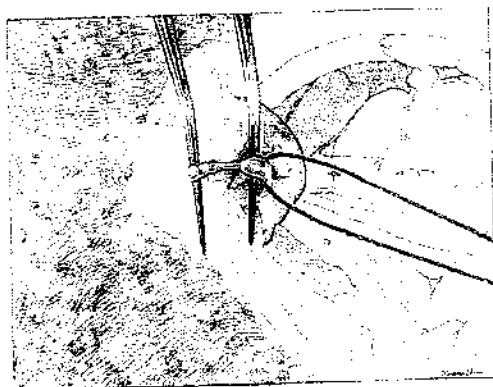


Figura 5

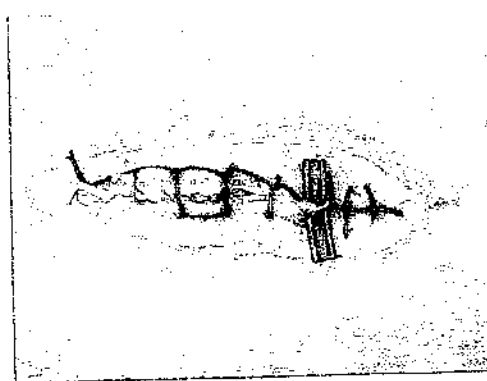


Figura 6

Legenda da Figura 5: Alça de ducto biliar foi exposta através do orifício no apêndice xifóide. O cateter levine nº 8 foi então introduzido sob esta.

Legenda da Figura 6: Fechamento da parede muscular com fio de poli-propileno nº 4-0 (sutura contínua), deixando-se o ducto biliar exposto sobre a musculatura, sob o cateter de levine.

3.2.1.3. Cuidados pós-operatórios

Após o término do ato operatório, os animais foram recolocados em suas respectivas gaiolas, com alimentação padronizada e ingesta de água “ad libitum”.

3.2.2. Avaliação clínica antes do sacrifício

Todos os animais tiveram os seguintes parâmetros avaliados

- Peso
- Coloração cutânea a nível das orelhas e patas
- Coloração da urina e das fezes

3.2.3. Avaliação macroscópica da cavidade abdominal

Após 30 dias de observação e estudo, os animais foram anestesiados com éter dietílico inalatório e colocados em prancha cirúrgica; tiveram seu abdome reaberto, obedecendo-se os mesmos cuidados e técnicas já descritos anteriormente.

Uma vez aberta a cavidade abdominal, foi feito exame detalhado de todo abdome e vísceras, seguindo-se a seguinte ordem:

- Observação da posição do cateter;
- Mensuração do ducto biliar em seu maior eixo (em cm);
- Caracterização de eventual ruptura do ducto biliar;
- Detecção da presença ou ausência de ascite;
- Avaliação macroscópica do fígado;
- Retirada do fígado e colocação dos fragmentos do lobo médio em formalina 10%.

3.2.4. Coleta de material

Para a coleta de sangue, as vísceras foram afastadas e a aorta abdominal puncionada com cânula calibre 24.

Foram coletados 3 ml de sangue em tubos de ensaio, os quais foram envoltos em papel alumínio e identificados. O sangue foi centrifugado (Centrífuga Fanem-204n) a 2.500 rotações por minutos, durante 10 minutos. Separou-se o soro com pipeta e, após colocação em tubos de plástico protegidos da luz, foram encaminhados ao laboratório em caixa de isopor com gelo.

O sacrifício dos animais foi feito através de secção cardíaca, estando os ratos ainda anestesiados. O fígado foi retirado e cortes transversais foram realizados no lobo médio.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SERVIÇO DE CIRCULANTE

3.2.5. Avaliação bioquímica do sangue

As dosagens séricas da aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama-glutamilttransferase (GGT), bilirrubinas totais (BT), bilirrubina direta (BD), bilirrubina indireta (BI), albumina (ALB) e proteínas totais foram realizados por método enzimático cinético com equipamento automatizado (Cobas).

3.2.6. Análise histológica do fígado

Foram retirados 2 fragmentos do fígado de cada animal, os quais foram colocados em formalina 10%, por tempo máximo de 24h. Após este período foram colocados em álcool 70%, até a inclusão em parafina e confecção das lâminas.

Os fragmentos obtidos foram processados no Laboratório de Anatomia Patológica do NMCE da FCM-UNICAMP. Inicialmente foram desidratados em bateria de álcool e xilol. Após a diafanização, foram incluídos em parafina e cortados em micrótomo, com espessura de 5 μ m cada. Após sua reidratação, foram fixados em lâminas e corados em Hematoxilina-Eosina e pelo tricrômio de Masson.

A análise microscópica das lâminas foi minuciosa, buscando-se as seguintes alterações morfológicas:

- Fibrose portal
- Formação de septos fibrosos porta-porta e/ou porta-centro
- Proliferação ductal portal e/ou septal
- Presença de nódulos regenerativos
- Colangite

Todas estas foram ainda semi-quantificadas em ausente (-), leve (+), moderada (++) e intensa (+++).

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os testes estatísticos utilizados, adotou-se o nível de significância de 5%. Para comparação das variáveis entre os grupos foi aplicado o teste de Mann-Whitney. Na comparação das medidas iniciais e finais, em cada grupo, foi utilizado o teste de Wilcoxon para amostras relacionadas (CONOVER, 1971).

4. RESULTADOS

4.1. EVOLUÇÃO DOS ANIMAIS NOS DIVERSOS GRUPOS

GRUPO OPERAÇÃO SIMULADA (OS) – Tiveram evolução satisfatória, sem constatação de óbito ($n = 9$).

GRUPO OBSTRUÇÃO BILIAR (OB) - Dos 47 animais submetidos à obstrução do ducto biliar, 15 (32%) foram eliminados do experimento: 8 ratos morreram antes dos 30 dias (17%) e em 7 não se caracterizaram os sinais clínicos de obstrução biliar (15%), sendo considerada falha da técnica: por erro na fixação do cateter, em 4, e ruptura do ducto biliar, em 3 animais. Desta maneira, apenas 32 animais foram submetidos à avaliação pós-operatória.

GRUPO CONTROLE (CO) – Evolução também satisfatória ($n = 7$).

4.2. AVALIAÇÃO PÓS-OPERATÓRIA

Entre os ratos em que a obstrução biliar foi induzida, os primeiros sinais da doença foram constatados após 12 h, através de coloração amarela da urina (colúria) e fezes esbranquiçadas (acolia fecal); após 24h foi notada cor amarela das patas, orelhas e cauda (icterícia).

Os valores médios do peso inicial e final dos animais, mostra que os ratos do grupo OB não ganharam peso, diferentemente dos animais do grupo OS e do grupo CO. O peso individual de cada animal se encontra em tabelas anexas (Anexos 1, 2 e 3). As médias destes se encontram na tabela abaixo.

Tabela 1: Peso médio inicial e final dos animais do grupo OB, OS e CO

Grupos de animais	média do peso inicial	média do peso final
grupo OB	300g	304g
grupo OS	298g	345g
Grupo CO	315g	343g

4.3. ANÁLISE MACROSCÓPICA DA CAVIDADE ABDOMINAL

Após a laparotomia, verificou-se que em todos os animais submetidos à obstrução biliar, o cateter foi encontrado com facilidade no local onde foi fixado.

Após a coleta de sangue para as dosagens bioquímicas, foi feita a avaliação da dilatação do ducto hepático, tendo sido constatado que todos os animais apresentaram expressivo aumento na medida de seu maior eixo, que variou de 2,0 a 8,5cm, com mediana de 4,5cm (Figura 7, Anexo 6).

A presença de ascite foi constatada em três animais, sendo que esses animais apresentaram ruptura do ducto biliar.

Em todos os animais com obstrução biliar o fígado mostrou-se pálido, endurecido e com micronódulos regularmente distribuídos pelo parênquima.

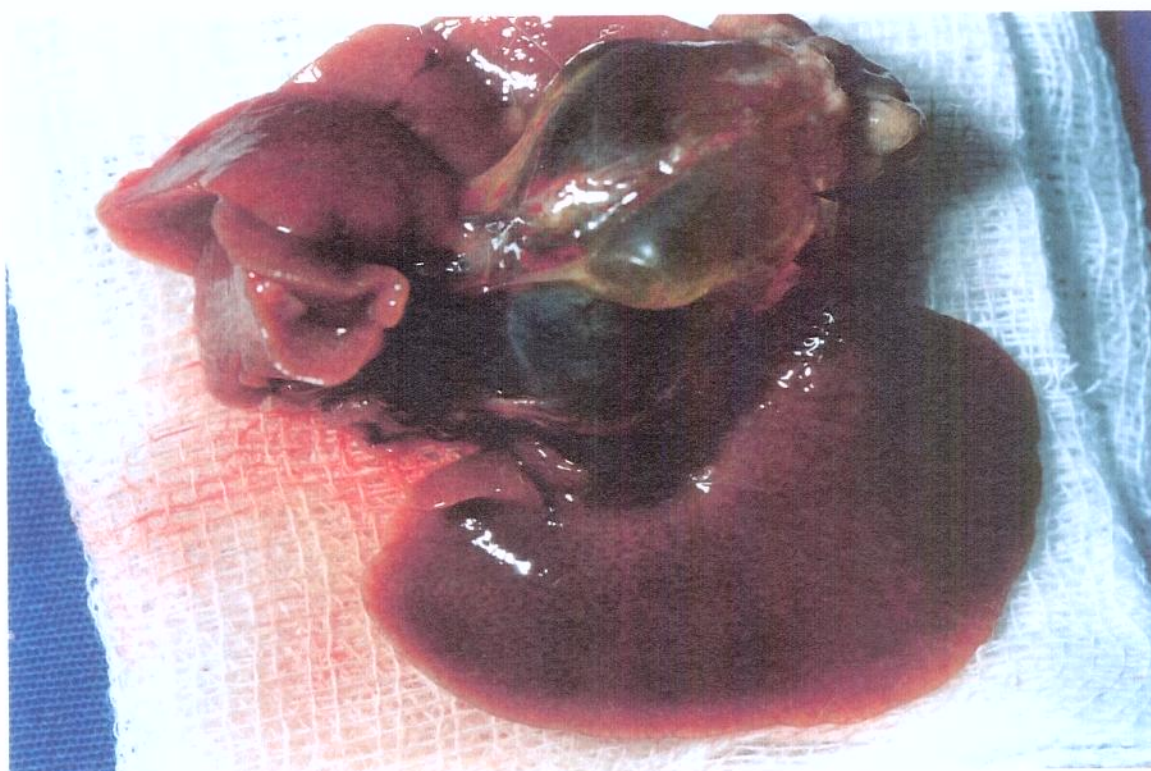


Figura 7: Ducto hepático intensamente dilatado (seta)

4.4. AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA DO SANGUE

4.4.1. Alanina aminotransferase (ALT)

Os resultados mostraram aumentos significativos de ALT nos ratos do grupo OB, quando comparados aos do grupos OS. No grupo OB a mediana foi de 157U/l e no grupo OS 46 U/l. (Figura 8, Anexos 4 e 5).

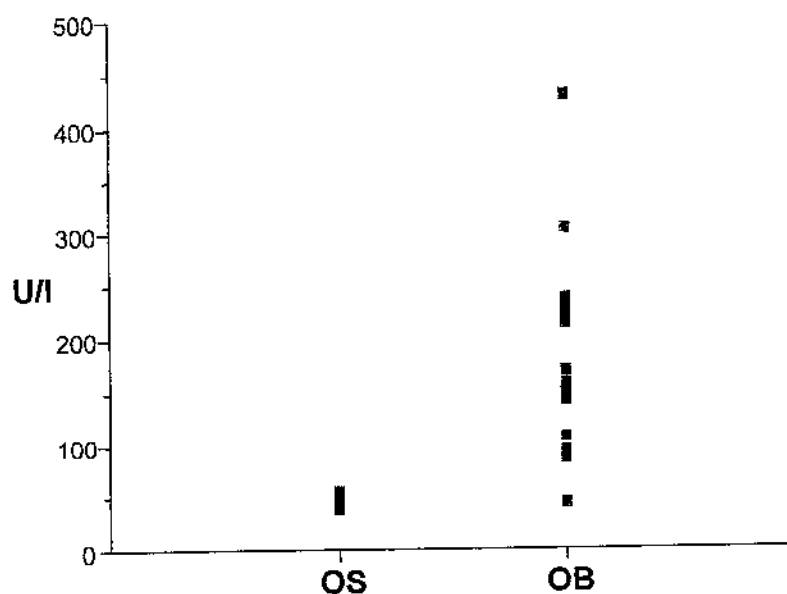


Figura 8: Representação dos valores séricos da ALT (U/l) entre os ratos submetidos à operação simulada (grupo OS) e ratos com obstrução biliar (grupo OB) ($p=0,0001$)

4.4.2. Aspartato aminotransferase (AST)

Aumentos significativos de AST foram detectados nos ratos com obstrução biliar (grupo OB) quando comparados aos valores do grupo OS. No grupo OB a mediana foi de 432 U/l e no grupo OS 140 U/l (Figura 9, Anexos 4 e 5).

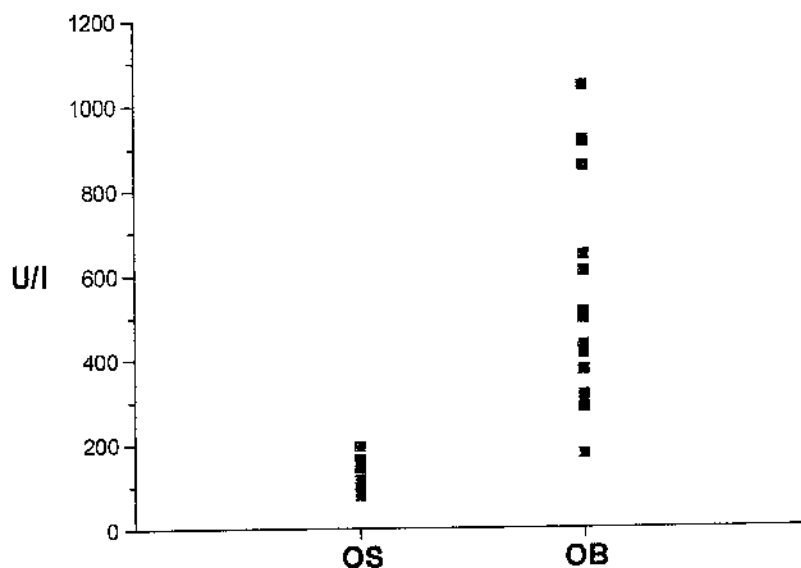


Figura 9: Representação dos valores séricos da AST (U/l) entre os ratos submetidos à operação simulada (grupo OS) e ratos com obstrução biliar (grupo OB) ($p=0,0001$)

4.4.3. Gama-glutamyltransferase (GGT)

Dosagens séricas da GGT foram obtidas em 31 casos do grupo OB, onde aumentos significativos foram observados, quando comparados aos do grupo OS. A mediana do grupo OB foi de 55 U/l e no grupo OS 1,0 u/l (Figura 10; Anexos 4 e 5).

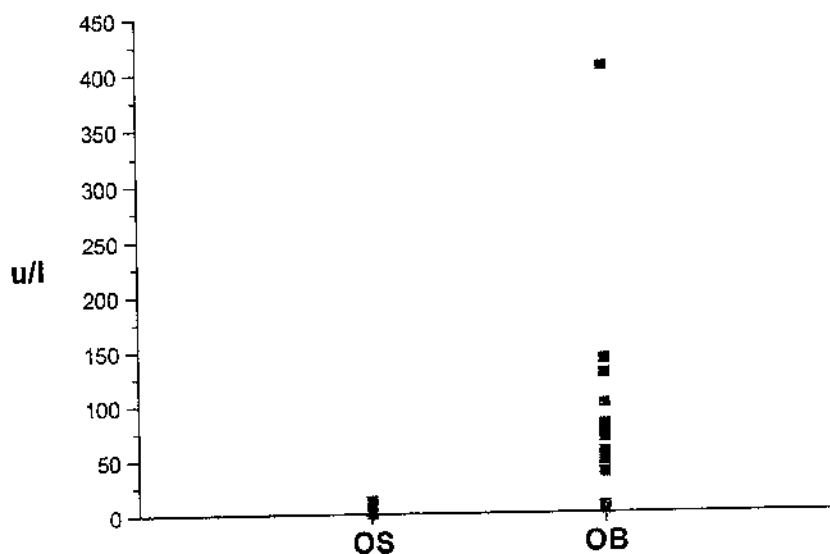


Figura 10: Representação dos valores séricos da GGT (U/l) entre os ratos submetidos à operação simulada (grupo OS) e ratos com obstrução biliar (grupo OB) ($p=0,0004$)

4.4.4. Fosfatase alcalina (FA)

Os valores expressos em mediana mostram aumentos significativos nos ratos obstruídos (grupo OB), quando comparados aos do grupo OS. A mediana no grupo OB foi de 524u/l e no grupo OS 94 u/l. (Figura 11; Anexos 4 e 5).

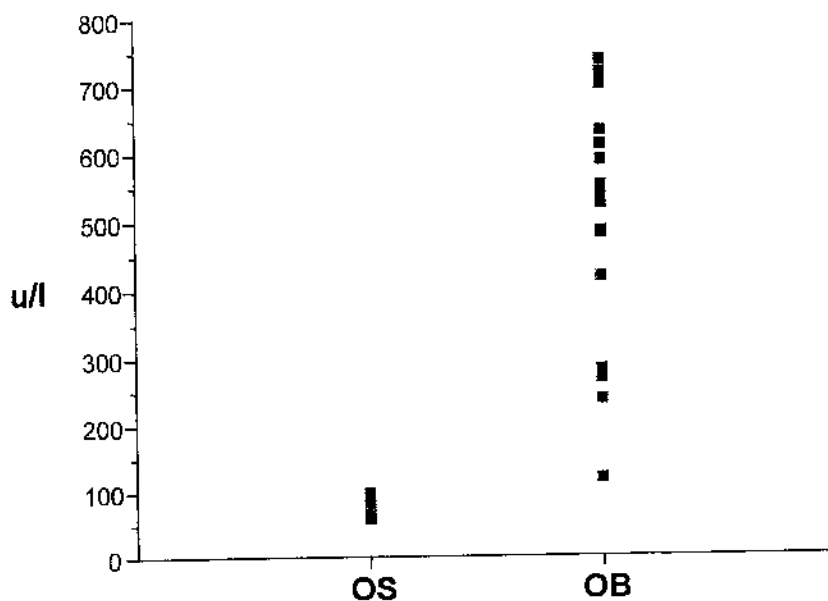


Figura 11: Representação dos valores séricos da FA (U/l) entre os ratos submetidos à operação simulada (grupo OS) e ratos com obstrução biliar (grupo (OB) ($p=0,0001$)

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

4.4.5. Proteínas totais (PT)

Não houve diferença significativa entre os valores de proteínas totais (PT), ao se comparar os valores dos grupos OS e OB. (Figura 12; Anexos 4 e 5).

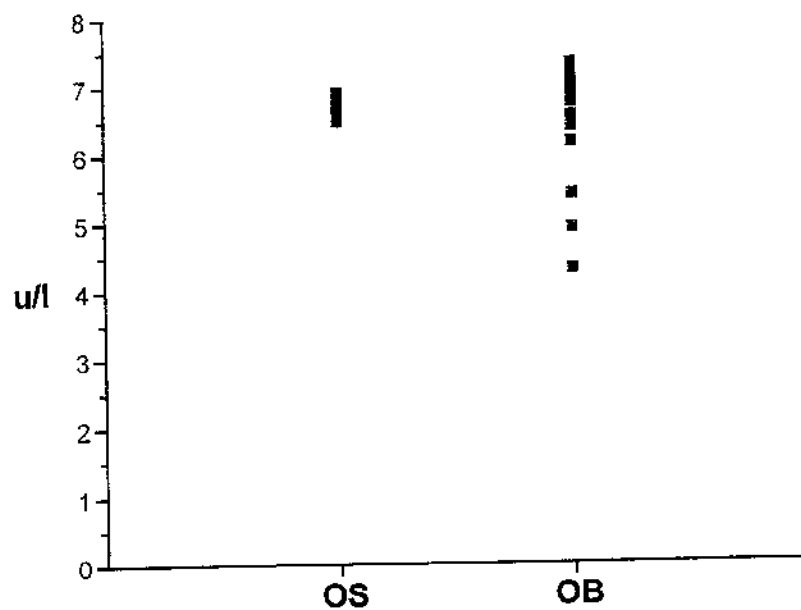


Figura 12: Representação dos valores séricos das proteínas totais entre ratos submetidos à operação simulada (grupo OS) e ratos com obstrução biliar (grupo OB) ($p=0,5352$)

4.4.6. Albumina (ALB)

Os valores expressos em mediana e índice de variação para ALB (em g/dl) mostraram redução entre os animais com obstrução (grupo OB) quando comparados aos dos grupo OS. A mediana do grupo OB foi de 2,36 g/dl e no grupo OS 3,06 g/dl. (Figura 13; Anexos 4 e 5).

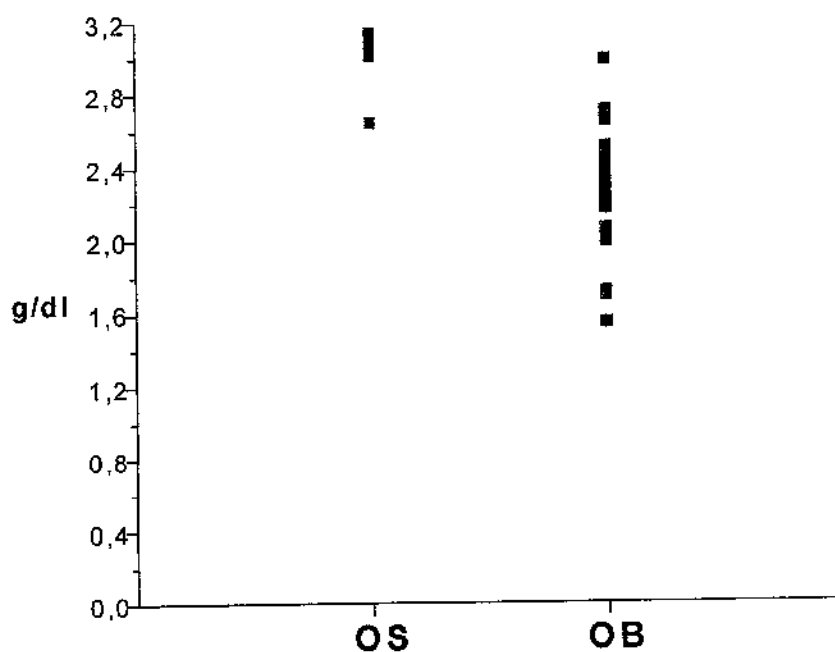


Figura 13: Representação dos valores séricos de albumina (g/dl) entre os ratos submetidos à operação simulada (grupo OS) e ratos com obstrução biliar (grupo OB) ($p=0,0001$)

4.4.7. Bilirrubina total (BT)

Nos ratos do grupo OB ocorreu aumento significativo nos valores de BT, com valor mínimo de 0,70 mg/dl e valor máximo de 15 mg/dl, com mediana do grupo OB de 8,30 mg/dl e do grupo OS de 0,19 mg/dl. (Figura 14; Anexos 4 e 5).

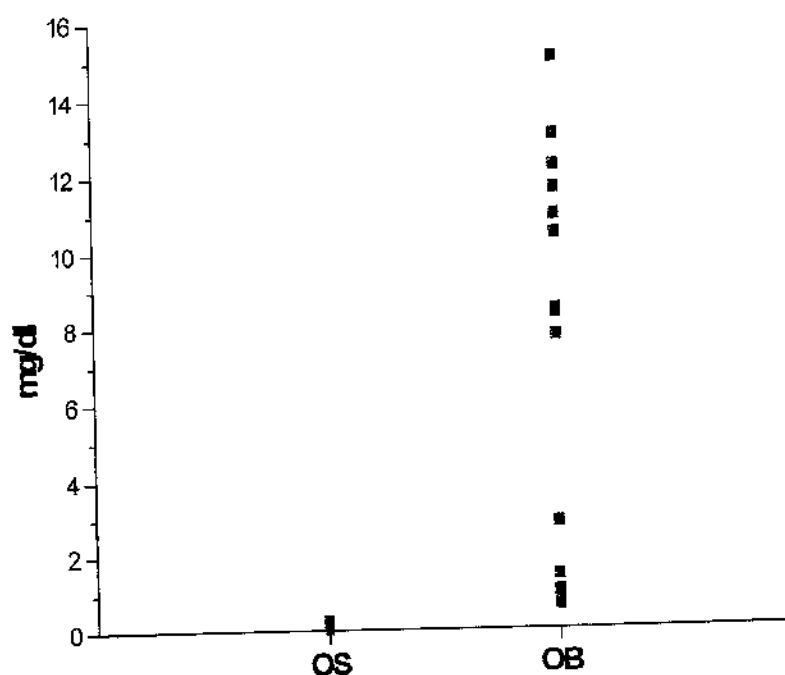


Figura 14: Representação dos valores séricos de BT entre os ratos submetidos à operação simulada (grupo OS) e ratos com obstrução biliar (grupo OB) ($p=0,0001$)

4.4.8. Bilirrubina direta (BD)

Nos ratos do grupo OB foi constatado aumento significativo nos valores das dosagens séricas das bilirrubinas diretas (BD), expressos em mg/dl, quando comparados aos valores do grupo OS. Grupo OB: mediana de 7,4 mg/dl; grupo OS: mediana de 0,42 mg/dl. (Figura 15; Anexos 4 e 5).

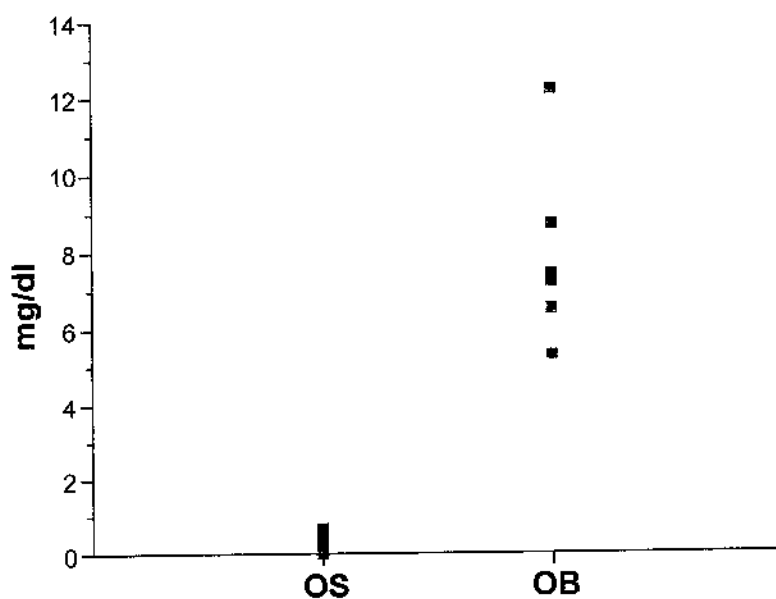


Figura 15: Representação dos valores séricos de BD entre os ratos submetidos à operação simulada (grupo OS) e ratos com obstrução biliar (grupo OB) ($p=0,0010$)

4.4.9. Bilirrubina indireta (BI)

Em apenas 7 ratos do grupo OB e 7 do grupo OS esses valores foram obtidos (valores expressos em mg/dl). Comparando-se os grupos, notamos aumento significativo dos valores entre os ratos obstruídos. grupo OB: mediana de 2,26 mg/dl; grupo OS: mediana de 0,03 mg/dl. (Figura 16; Anexos 4 e 5).

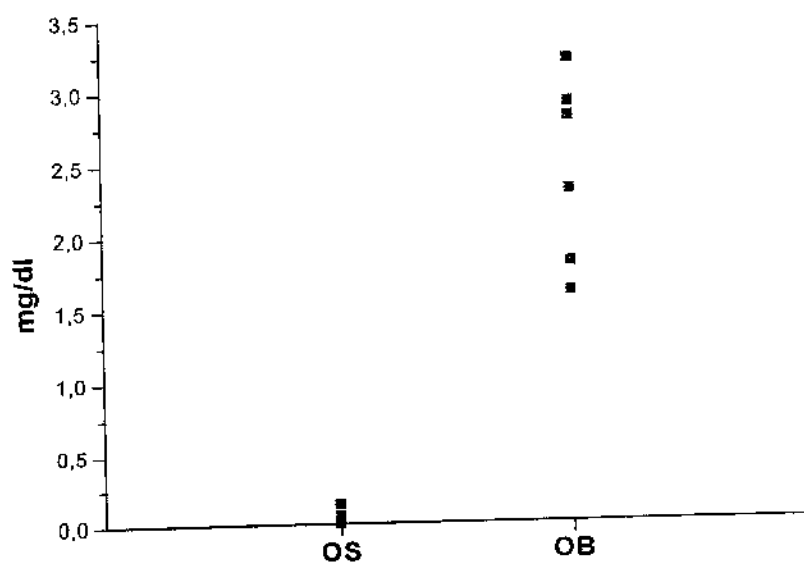


Figura 16: Representação dos valores séricos de BI entre os ratos submetidos à operação simulada (grupo OS) e ratos com obstrução biliar (grupo OB) ($p=0,0010$)

4.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA DO FÍGADO

A avaliação histológica do fígado dos 32 ratos do grupo OB mostrou graus variáveis de fibrose portal, proliferação de ductos e formação de septos fibrosos. Estas alterações histológicas não foram observadas nos fígados dos animais do grupo CO e grupo OS (Tabela 2).

Tabela 2: Alterações histológicas semi-quantificadas observadas nos ratos submetidos à obstrução biliar (grupo OB)

Rato	Fibrose portal	Septos	Proliferação ductal	Nódulos	Colangite
1	++	-	++	-	+
2	++	+++	+++	+++	-
3	+	+++	+++	+++	-
4	++	++	+++	++	+
5	+	-	++	-	+
6	+	+++	+++	+++	+
7	+	++	+++	-	+
8	+	++	+++	+	+
9	+	+++	+++	+	-
10	++	+++	+++	+++	+
11	++	++	+++	-	-
12	+	++	++	-	-
13	+	++	+++	-	+
14	++	+++	+++	+	+
15	++	+++	+++	++	+
16	+	++	+++	++	+
17	+	++	+++	++	+
18	+	++	+++	++	+
19	+	+	+++	-	+
20	+	++	+++	++	+
21	+	++	++	+	+
22	-	++	+++	++	-
23	+	++	+++	++	+
24	+	+	+++	-	+++
25	+	++	+++	+	+
26	+	++	++	-	-
27	+	++	+++	+	+
28	+	+++	+++	+++	-
29	+	+++	+++	+++	++
30	+	++	+++	-	++
31	+	++	++	++	-
32	+	++	+++	+	-

Legenda: (-) = ausente; (+) = leve; (++) = moderada; (+++) = intensa

4.5.1. Fibrose portal

Esta foi observada em 31 ratos (96,9%) estando ausente em apenas 1 animal (3,1%) (Figura 17; Tabela 3). Foi considerada moderada em 7 ratos (21,9%) e leve em 24 (75% – Figuras 18 e 19). Em nenhum caso constatou-se fibrose portal intensa.

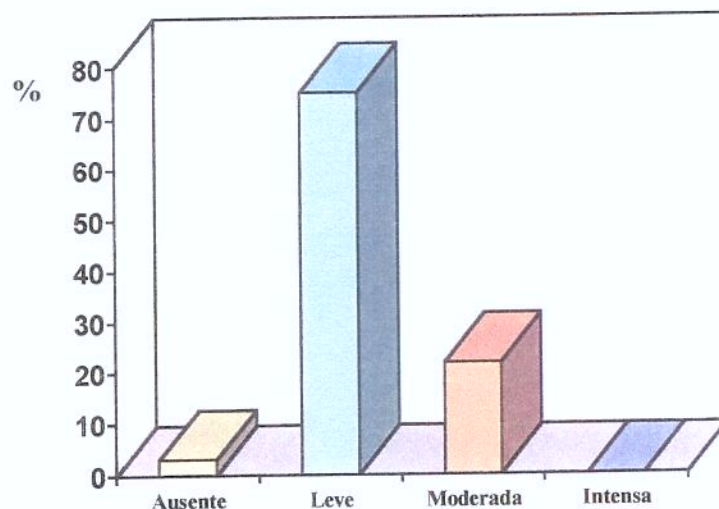


Figura 17: Gráfico representativo dos valores percentuais de fibrose portal observada nos casos do grupo OB

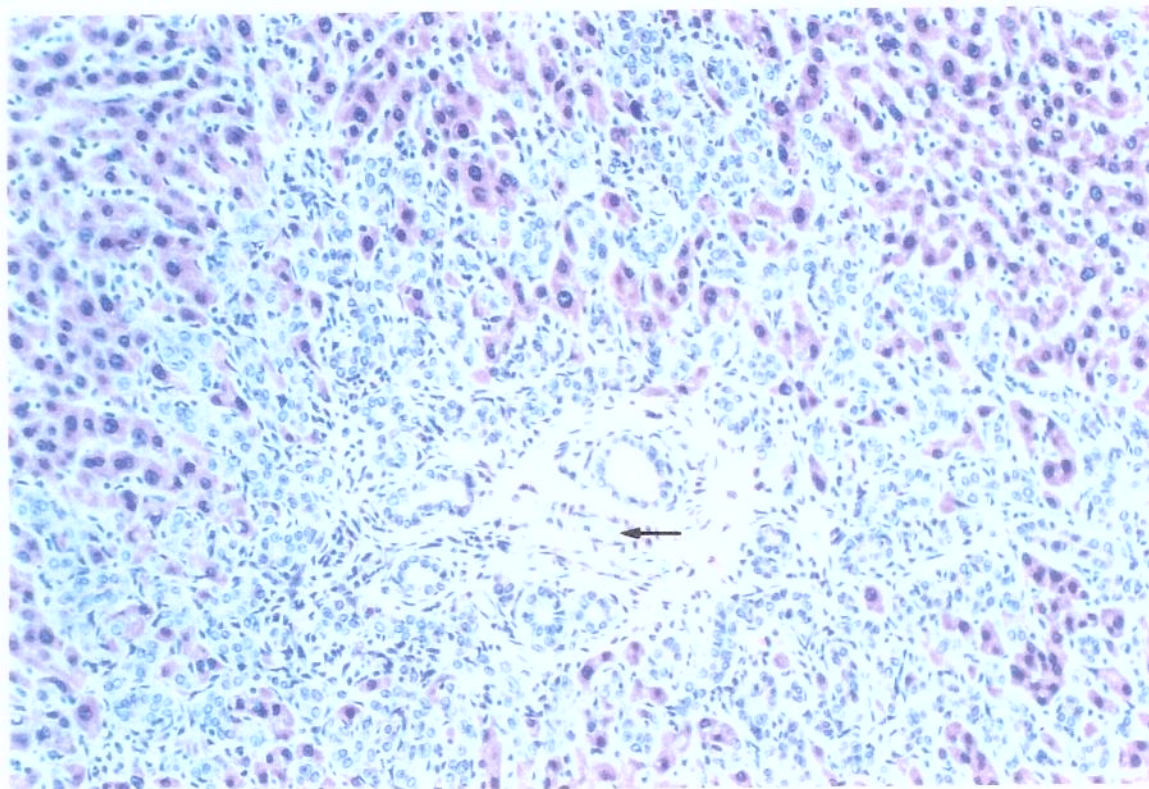
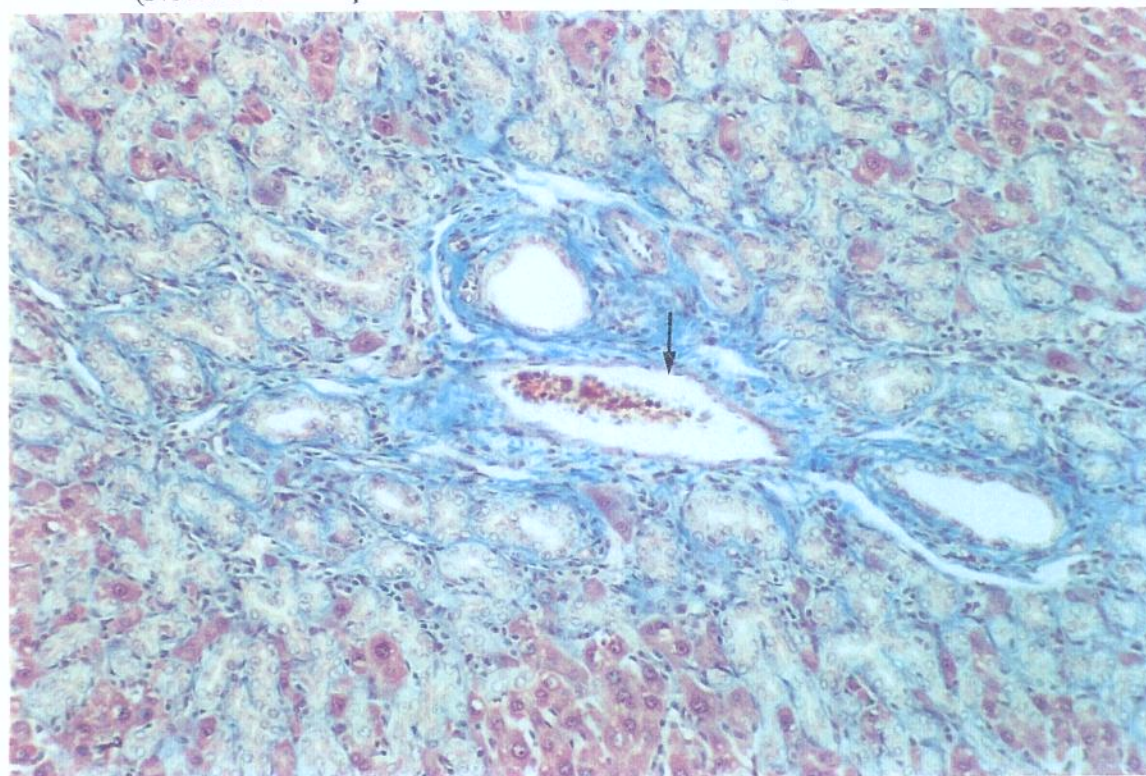


Figura 18: (H-E - 200X) e **Figura 19:** (tricroômio de Masson - 200X): Fibrose portal leve.
(Notar a diminuição do diâmetro do ramo venoso portal: setas).



4.5.2. Septos fibrosos

Estes se desenvolveram em 30 ratos do grupo OB (93,8%) (Figura 20; Tabela 3). Em 9 ratos esta proliferação foi considerada intensa (28,2%), em 19 ratos, moderada (59,4% – Figura 21) e em 2 ratos leve (6,2%). Somente 2 ratos (6,2%) não exibiram formação de septos fibrosos.

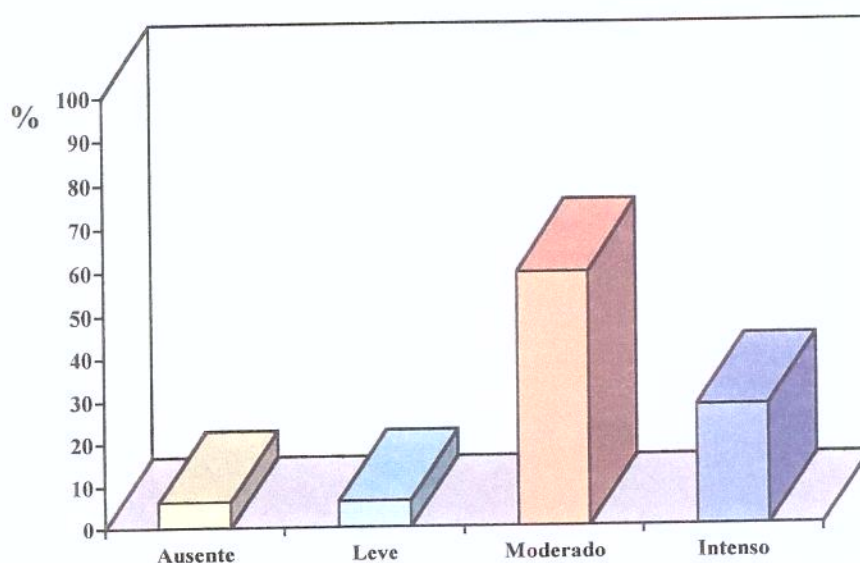


Figura 20: Gráfico representativo dos valores percentuais de septos fibrosos presentes nos casos do grupo OB

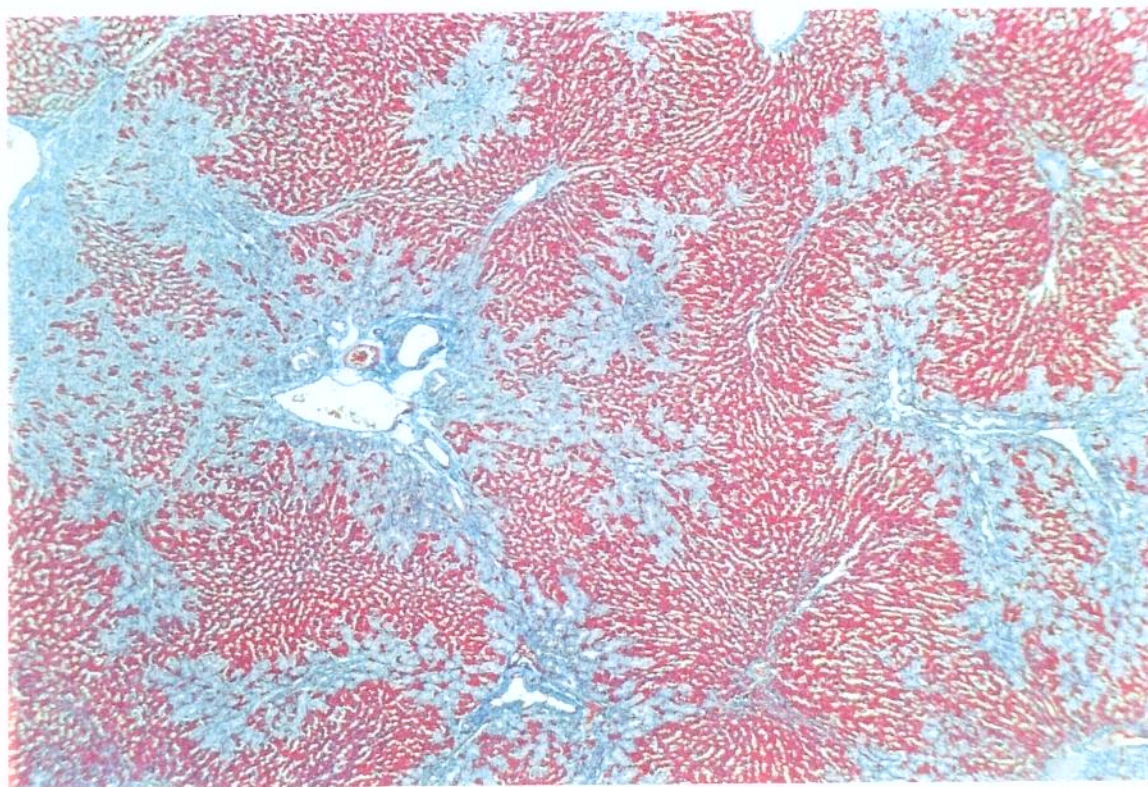


Figura 21: Moderada proliferação de septos fibrosos de localização porta-porta e porta-centro (tricroômio de Masson - 40X)

4.5.3. Proliferação de ductos biliares

Esta foi observada em todos os casos do grupo OB (Figura 22; Tabela 3), tendo sido graduada como intensa em 26 casos (81,3% - Figura 23) e moderada em 6 (18,7%); não foi constatado nenhum caso com grau leve ou ausência de proliferação de ductos.

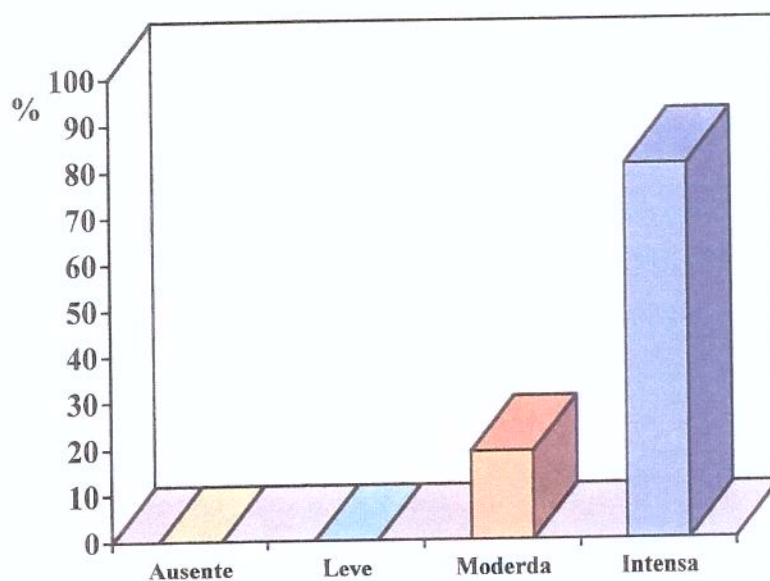


Figura 22: Gráfico representativo dos valores percentuais de proliferação de ductos biliares observada nos caso do grupo OB

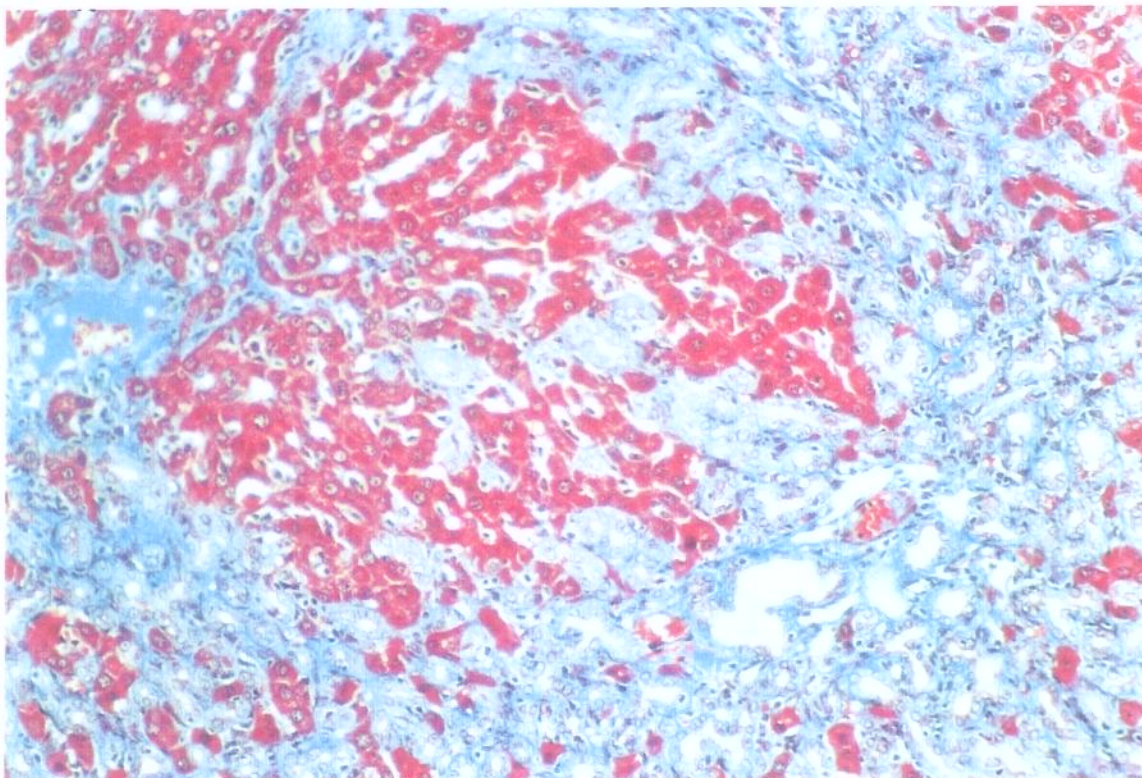


Figura 23: Intensa proliferação ductular portal e septal. (tricroômio de Masson - 200X)

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

4.5.4. Presença de nódulos regenerativos

Em 22 (68,7 %) dos ratos do grupo OB observaram-se nódulos regenerativos envoltos por septos fibrosos (Figura 25). Estes eram muito numerosos (intensa quantidade) em 6 ratos (18,1%); havia moderada quantidade em 9 ratos (28,1%) e esparsos (quantidade leve) em 7 ratos (21,9%). Em 10 ratos (31,3%) não houve formação de nódulos (Figura 24; Tabela 3).

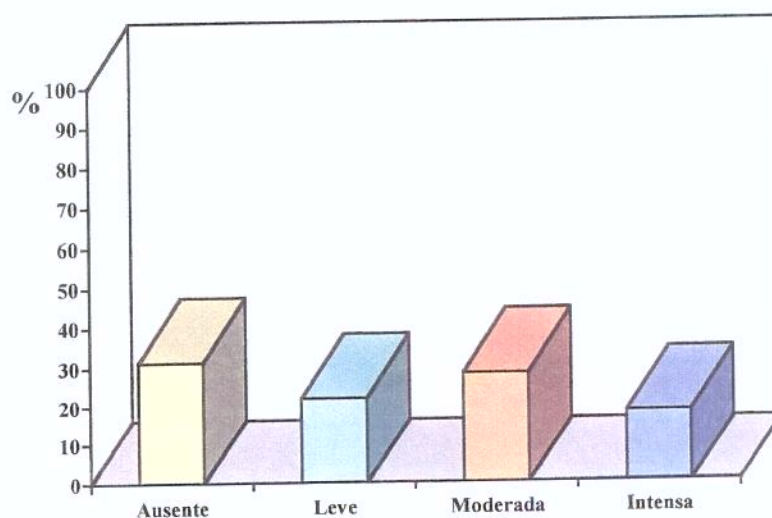


Figura 24: Gráfico representativo dos valores percentuais dos nódulos regenerativos presentes nos casos do grupo OB%

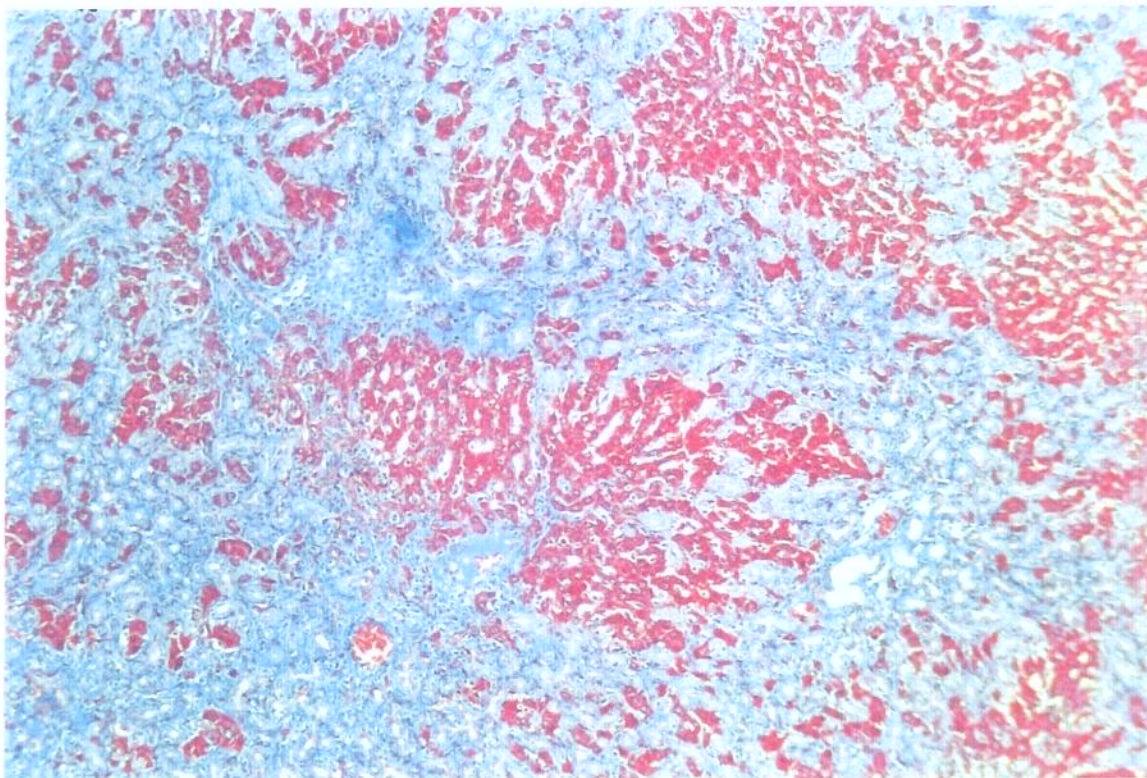


Figura 25: Notar um nódulo regenerativo totalmente envolto por septos fibrosos, na espessura dos quais há moderada proliferação ductular. (tricroômio de Masson - 100X)

4.5.5. Colangite

Esta foi observada em 22 casos (68,4%) (Figura 26; Tabela 3), sendo leve e focal na maioria dos casos - 19 ratos (59,4%), e moderada em apenas 3 ratos (9,4 %); em nenhum caso foi de grau intenso e em 10 ratos (31,2%) esteve ausente.

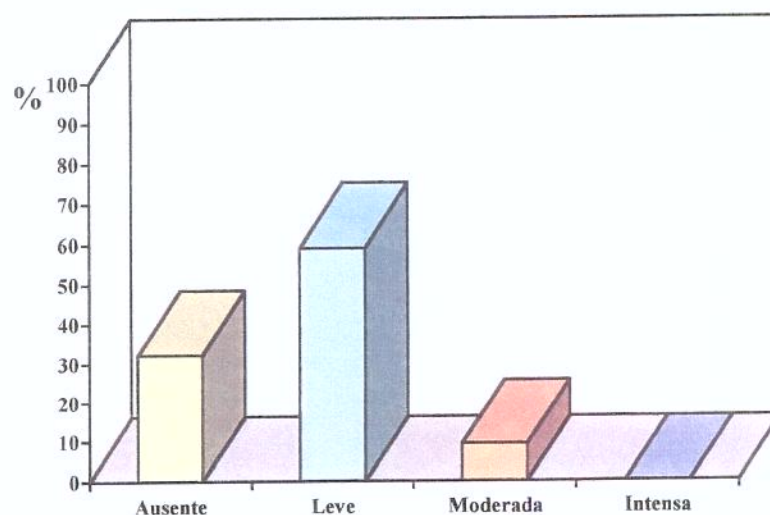


Figura 26: Gráfico representativo dos valores percentuais de colangite presentes nos casos do grupo OB

5. DISCUSSÃO

A cirrose biliar experimentalmente desenvolvida em animais sofre a influência de vários fatores relacionados com sua indução, incluindo a espécie animal utilizada. Várias espécies de animais já foram utilizadas, sendo o cão e o rato os animais mais indicados para esse tipo de experimento (KOCK-WESER *et al.*, 1952; OHLSSON *et al.*, 1970; KOUNTOURAS *et al.*, 1984; BOMZOM *et al.*, 1986; DIAMOND *et al.*, 1990; CASTRO E SILVA JR. *et al.*, 1998). No nosso experimento, utilizamos ratos machos da linhagem Wistar, devido a maior disponibilidade destes animais pelo Biotério Central da UNICAMP, pelo fácil manuseio e por seu pequeno porte.

Vários são os modelos experimentais descritos na literatura, desenvolvidos com a finalidade de se estudar a fibrose e a cirrose biliar por obstrução do ducto hepático. Alguns com sucesso na indução, porém sem muito sucesso na intensidade e duração da doença. Neste sentido, vários estudos foram desenvolvidos com o objetivo de tentar solucionar as principais causas do insucesso de alguns modelos (KOCK-WESER *et al.*, 1952; TRAMS & SYMEONIDIS, 1957; KOUNTOURAS *et al.*, 1984; HOLMERG, HEDERSTROM, IHSE, 1985; CASTRO E SILVA JR. & MAZZETO, 1991).

Os modelos experimentais mais citados na literatura para a obtenção de obstrução biliar, baseiam-se na interrupção do fluxo biliar do fígado para o duodeno, através de ligadura do ducto biliar com fio não absorvível, e se desenvolvem com ratos. Estes métodos incluem tanto ligadura simples do ducto biliar (KOCK-WESER *et al.*, 1952; TRAMS & SYMEONIDIS, 1957), ligadura dupla com canulização do ducto biliar (ACCATINO *et al.*, 1979; KOUNTOURAS *et al.*, 1984), ligadura e enovelamento contínuo do ducto biliar (CASTRO E SILVA JR. *et al.*, 1998), ou ainda ligadura dupla e transecção do ducto biliar (KOCK-WESER *et al.*, 1952; KOUNTOURAS *et al.*, 1984). No cão, preconiza-se a ligadura com fios inabsorvíveis, distalmente ao último ducto lobar (próximo ao duodeno), seguida de colecistectomia. (KOYAMA *et al.*, 1981; BOSCH *et al.*, 1983; WILLEMS, VILLENEUVE, HUET, 1986.)

De maneira geral, o desenvolvimento, a gravidade e a extensão das alterações morfológicas dependem da espécie animal, do grau, da duração, do local e do método empregado para a obstrução biliar, podendo ainda haver influência da idade dos animais (KOCK-WESER *et al.*, 1952; OHLSSON *et al.*, 1970; KOUNTOURAS *et al.*, 1984;

BOMZON *et al.*, 1986; MEDEIROS *et al.*, 1988; DIAMOND *et al.*, 1990; ZIMMERMANN *et al.*, 1992; ZIMMERMANN *et al.*, 1994).

MEDEIROS *et al.* (1988) estudaram a influência da idade na indução da cirrose biliar em ratos. Obtiveram resultados diferentes na análise morfológica de ratos jovens, adultos e velhos; constatando que a presença de nódulos foi intensa nos animais jovens, não ocorrendo em animais adultos e velhos.

O nosso estudo foi realizado com animais adultos (12 semanas), com obtenção de obstrução biliar clinicamente detectada em 40 dos 47 animais inicialmente submetidos à obstrução biliar (85% dos sobreviventes) e desenvolvimento de nódulos regenerativos em 68,7% dos 32 que permaneceram no grupo OB. Nossos resultados foram semelhantes aos obtidos por KOUNTOURAS *et al.* (1984), MAZZETO & CASTRO E SILVA JR. (1989), MELZER *et al.* (1992); SANTOS (1993); SANTOS *et al.* (1998).

O peso inicial dos ratos do grupo OB (média de 300 g) foi semelhante aos do grupo OS (298 g) e do grupo CO (315 g), estando de acordo com a idade dos animais (12 semanas). Estes foram considerados, portanto, em adequado estado nutricional. Apesar de ter sido detectado certo grau de anorexia após a obstrução biliar, o que também foi observado por TRAMS & SYMEONIDIS (1957), não houve redução do peso dos ratos após 1 mês de estudo, com manutenção de seu peso médio (304 g). Ou seja, o estado nutricional dos ratos do grupo OB se manteve bom durante todo o experimento, não tendo, aparentemente, influenciado negativamente na evolução clínica dos animais.

Dois fatores são muito importantes no insucesso da indução de obstrução biliar: o grande número de morte dos animais nas duas primeiras semanas e o processo de recanalização que geralmente ocorre no ducto biliar (CAMERON & HASAN, 1958; HOLMBERG *et al.*, 1985; CASTRO E SILVA JR. *et al.*, 1998).

Desenvolvemos um modelo experimental alternativo, que provocou a interrupção do fluxo bileo-duodenal, com total oclusão das vias biliares, porém sem lesão ductal, não sendo realizada ligadura, canulização ou ressecção das vias biliares.

Com a utilização deste modelo de tração do ducto biliar, obtivemos sobrevida de 100% nas duas primeiras semanas e de 83% em 4 semanas. Este substancial aumento da sobrevida está, portanto, relacionado aos procedimentos cirúrgicos adotados, os quais foram simplificados ao máximo. O procedimento cirúrgico simples, por não promover grande manuseio das vias biliares, evita a lesão ductal, bem como sangramentos e lesão de outros órgãos, que são consideradas as principais causas de mortalidade nas duas primeiras semanas (CAMERON & HASAN, 1958; CASTRO E SILVA JR. *et al.*, 1998). O tempo de duração do ato operatório também foi pequeno: máximo de 15 min.

Outro procedimento muito importante adotado, foi a redução da incisão de laparotomia (cerca 1,5 cm), favorecendo a cicatrização, evitando sangramentos e diminuindo o risco de infecções.

A maioria dos procedimentos operatórios relatados em animais de pequeno porte despreza cuidados de assepsia (SANTOS, 1993; SANTOS *et al.*, 1998). No nosso experimento, no entanto, cuidados especiais de assepsia foram observados, durante todo o procedimento cirúrgico. E após o término do ato operatório, os animais tiveram toda a parede abdominal limpa com solução fisiológica 0,9%. (É importante uma adequada avaliação da incisão nas primeiras horas pois, na ocorrência de eventual deiscência, os animais passam a se “limpar” e os pontos tendem a se soltar).

Nos experimentos citados na literatura, a anestesia geralmente é feita mediante a administração de éter por via inalatória (MELZER *et al.*, 1992; SANTOS, 1993; SANTOS *et al.*, 1998) ou pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso) injetado na cavidade peritoneal (ZIMMERMANN *et al.*, 1992). No nosso trabalho, o éter por via inalatória foi o anestésico utilizado, devido ao tempo de duração do procedimento ser de 12 a 15', não havendo necessidade de se manter o animal anestesiado por muito tempo.

Durante o procedimento cirúrgico, o afastamento da borda inferior do fígado e a tração ântero-caudal da alça duodenal geralmente expõem as estruturas biliares (SANTOS, 1993; SANTOS *et al.*, 1998). Realizamos este procedimento com o auxílio de uma haste flexível de algodão e gaze cirúrgica, o que evitou sangramentos sendo, portanto, outro fator relacionado à diminuição do número de morte dos animais.

Na maioria das vezes, os métodos descritos na literatura promovem o isolamento do ducto biliar através de pinça angulada de dissecação fina (SANTOS, 1993; SANTOS *et al.*, 1998). No nosso estudo utilizamos a pinça angulada de dissecação para reparar o ducto biliar, com um fio de polipropileno 4-0. Em seguida o ducto biliar foi isolado e dissecado com pinça de Bakes e haste flexível de algodão. Este procedimento, além de ser menos traumático, é mais rápido e não causa danos à artéria hepática, à veia porta ou ao canal pancreático.

Outro fator muito discutido no insucesso das técnicas de indução da obstrução do ducto hepático, seja com ligadura simples e única, ou ligadura dupla com ou sem secção da via biliar, é a ocorrência de recanalização (KOUNTOURAS *et al.*, 1984; CASTRO E SILVA JR. *et al.*, 1998).

O procedimento de recanalização pode ocorrer pela invaginação do ducto hepático, localizado abaixo do local da ligadura para a parte dilatada da via biliar (TRAMS & SYMEONIDIS, 1957), ou pode se dar ainda pela proliferação do epitélio biliar do ducto hepático abaixo da ligadura, alcançando, com o passar do tempo, a porção proximal dilatada da via biliar (WRIGHT & BRAITHWAITE, 1962).

CASTRO E SILVA JR. *et al.* (1998) aventaram a possibilidade de que a permeabilidade do ducto biliar ligado pudesse ocorrer devido à associação dos dois mecanismos acima, ou em decorrência de outros fatores ainda não esclarecidos. Para se evitar o processo de recanalização da via biliar ligada, concluíram que seria necessário se interpor algum material protético, o qual ficaria entre a porção sacular distendida do ducto hepático (acima) e a parte não dilatada (abaixo). Desta maneira, idealizaram dois métodos para a indução experimental da colestase extra-hepática: obstrução do ducto biliar por enovelamento, e obstrução por prótese de silicone. Seus resultados foram satisfatórios, conseguindo evitar o fenômeno de recanalização. No entanto, o insucesso continuou relacionado ao grande número de morte dos animais nas duas primeiras semanas. Para tentar aumentar esta sobrevida, nos animais submetidos à obstrução biliar por 5 semanas, introduziram tratamento sub-cutâneo com vitamina K, visando a diminuição de sangramento, com o que conseguiram sobrevida de 50% a 80%.

O modelo de KOUNTOURAS *et al.* (1984) combinou secção, ligadura do ducto biliar distal e introdução de um cateter de polietileno com diâmetro interno de 0,2 mm no coto proximal, com ligaduras que englobam as duas estruturas. Em seguida o fluxo biliar foi observado por 10', confirmando-se a permeabilidade do cateter, o qual é então amarrado e alocado no tecido subcutâneo. Este método teve a vantagem da obtenção de fornecer amostra de bile para análise, além de facilitar o restabelecimento do fluxo biliar. Neste modelo, a cirrose biliar se desenvolveu com 4 semanas de obstrução, resultado semelhante ao obtido com ligadura dupla seguida de secção do ducto biliar por KOUNTOURAS *et al.* (1984).

Outra alternativa de obstrução extrínseca do ducto biliar foi a proposta por POSNER *et al.* (1990), onde o ducto biliar foi isolado e enlaçado com uma fita vascular de 2 mm de largura. Em seguida, as duas extremidades da fita foram exteriorizadas e fixadas à parede abdominal. O tempo do estudo foi de 10 dias, com boa sobrevida neste período. Os resultados bioquímicos foram similares aos obtidos com métodos convencionais, não havendo menção às alterações histológicas hepáticas.

Este método, no entanto, propiciou maior fragilidade do ducto biliar, o qual pode se romper após algum tempo.

No desenvolvimento do nosso modelo experimental, concordamos com a utilização de um material protético, o qual se manteve entre a porção sacular distendida do ducto hepático (acima) e a parte não dilatada (abaixo) (CASTRO E SILVA JR. *et al.*, 1998) e com a técnica de POSNER *et al.* (1990), onde o ducto hepático é enlaçado e não ligado ou seccionado. A diferença do nosso modelo, no entanto, está na metodologia empregada. Ao promovermos a tração do ducto hepático até o apêndice xifóide, que foi enlaçado no cateter, provocamos uma angulação acentuada, produzindo um afastamento significativo entre as porções proximal e distal do ducto hepático, dificultando o processo de recanalização. No entanto, caso houvesse interesse em se estudar o processo de desobstrução, este método também o permitiria, pois o cateter poderá ser retirado facilmente e o ducto biliar deixará de sofrer tração. A oclusão da via biliar será aliviada e, dependendo do seu grau ou tempo, poderá até desaparecer.

Com o desenvolvimento do nosso modelo, sinais clínicos de obstrução biliar foram constatados em 85% dos 47 ratos inicialmente submetidos à obstrução biliar, o que pode ser comparado com outras técnicas que promovem a ligadura do ducto biliar, seguida de transecção, ressecção ou enovelamento, levando à cirrose biliar secundária em 50 a 80% dos ratos sobreviventes (KOUNTOURAS *et al.*, 1984; MELZER *et al.*, 1992; SANTOS, 1993; CASTRO E SILVA JR. *et al.*, 1998).

Com a presente técnica de obstrução do ducto biliar, as alterações bioquímicas observadas foram mais acentuadas do que muitas das descritas na literatura para cinco ou mais semanas de observação (TRAMS & SYMEONIDIS, 1957; CAMERON & HASAN, 1958; JOHNSTONE & LEE, 1976; FRANCO *et al.*, 1979; KOUNTOURAS, SCHEUER, BILLING, 1985; ZIMMERMANN *et al.*, 1992) e semelhantes às obtidas por KOUNTOURAS *et al.* (1984) e SANTOS (1993).

Na colestase extra-hepática, a hiperbilirrubinemia conjugada, isoladamente, é alteração clássica (WEISS *et al.*, 1983; SOARES, 1991). Entretanto, com a manutenção da obstrução biliar prolongada, danos funcionais nos hepatócitos, acabam levando à elevação também da bilirrubina não conjugada (POPPER & SCHAFFNER, 1970), produzindo um quadro de hiperbilirrubinemia mista.

Os mecanismos que explicam a regurgitação dos constituintes biliares do compartimento biliar para a corrente sangüínea são especulativos (DESMET, 1994; WEINBREN, HADJIS, BLUMGART, 1985). É provável que inicialmente ocorra regurgitação bileo-linfática e, à medida que a pressão aumenta nos ductos biliares, acaba havendo também regurgitação bileo-venosa. Além deste escape intercelular, é também citada uma regurgitação trans-hepatocítica, mediante inversão da polaridade secretora dos hepatócitos (DESMET, 1994; WEINBREN *et al.*, 1985). Por fim, na vigência de canalículos dilatados, com presença de trombos de bile em seu interior, pode ainda ocorrer ruptura destes para os sinusóides, com necrose dos hepatócitos circunjacentes.

No presente trabalho, ao final de 30 dias de obstrução biliar, os valores séricos de bilirrubinas totais variaram de 0,07 a 15,0 mg/dl (mediana de 8,38); a bilirrubina conjugada variou de 5,3 a 7,2 mg/dl (mediana de 7,38) e a bilirrubina não conjugada de 1,6

a 3,2 mg/dl (mediana de 2,26). Em 4 ratos, os valores séricos de bilirrubina total mostraram aumento pouco significativo ou se mantiveram normais, quando comparados aos outros animais deste mesmo grupo. No entanto, estes ratos apresentaram dilatação do ducto hepático, aumento do volume do fígado e alterações histológicas significativas, com presença de moderada quantidade de nódulos regenerativos. Excetuando-se estes animais, os valores de bilirrubina total observados no nosso experimento foram semelhantes, ou até superiores, aos citados na literatura (EDLUND, 1948; TRAMS & SYMEONIDIS, 1957; CAMERON & HASAN, 1958, FRANCO *et al.*, 1979; KOUNTOURAS *et al.*, 1984; ZIMMERMANN *et al.*, 1992).

O aumento da alanina aminotransferase (ALT) e da aspartato aminotransferase (AST) é atribuído à lesão ou destruição de tecidos ricos em aminotransferases, ou a alterações na permeabilidade da membrana celular que permitam a sua liberação para a corrente sangüínea (ABBRUZZESE & JEFFERY, 1969; VITAL *et al.*, 1982., PATWARDHAN, SMITH, FARMELANT, 1987).

VITAL *et al.* (1982), em trabalhos experimentais também em ratos, verificaram que na obstrução biliar extra-hepática aguda, em função do aumento abrupto da pressão intra-canalicular, ocorreram alterações ultra-estruturais e aumento da permeabilidade das junções inter-hepatocelulares o que, eventualmente, poderia explicar o escape das aminotransferases para o sangue. A queda dos níveis séricos das aminotransferases, a despeito da manutenção da obstrução biliar, pode decorrer da redução da concentração dessas enzimas nos hepatócitos (ARONSEN, 1961) ou pela diminuição da pressão intracanalicular.

Os nosso experimento, após 4 semanas de obstrução biliar, os valores da ALT variaram de 88 a 430 u/l (mediana de 157) e, da AST, de 172 a 1042 u/l (mediana de 432), valores estes, portanto, superiores aos encontrados por ABBRUZZESE & JEFFERY (1969); VITAL *et al.* (1982); REICHEN *et al.* (1988) e KRÄHENBÜHL, STUCKI, REICHEN (1992), e que sugerem a persistência da obstrução biliar, com aumento da pressão intracanalicular.

Os níveis séricos da fosfatase alcalina apresentam pico máximo após 1 dia de indução da obstrução biliar extra-hepática, com diminuição nos dias subseqüentes, e estabilização dos valores no 7º dia da obstrução (KAPLAN & RIGHETTI, 1970; VITAL *et al.*, 1982; HATOFF *et al.*, 1985; PAHWARDAN, SMITH, FARMELANT *et al.*, 1987; CASTRO E SILVA JR. & MAZZETO, 1991). KAPLAN & RIGHETTI (1970); WOOTTON, NEALE, MOSS (1977) e HATOFF *et al.*, (1985), demonstraram que 12 a 24 h após a indução da colestase havia aumento da síntese dessa enzima pelos hepatócitos, com diminuição dos níveis séricos a partir do 2º dia de colestase. Os valores séricos encontrados a partir deste período teriam origem predominantemente no epitélio biliar (KAPLAN, KANEL, SINGER, 1979; SLOTT, LIU, TAVOLONI, 1990).

No nosso experimento, os valores de fosfatase alcalina variaram de 117u/l a 717 u/l, com mediana de 524 u/l, sendo superiores aos encontrados por CAMERON & HASAN (1958); FRANCO *et al.* (1979); ZIMMERMANN *et al.* (1992) e CASTRO E SILVA JR. & MAZZETO (1991).

A elevação dos níveis de gama-glutamilttransferase (GGT) é observada quase que exclusivamente em doenças do fígado, ductos biliares e pâncreas, costumando ser expressiva nas colestases. Esta elevação não permite, no entanto, diferenciação etiológica entre obstrução biliar extra e intra-hepática (SZASZ, 1969). Em pacientes anictérios, a determinação da GGT tem grande valor (RUTEMBERG, GOLDBARG, PINEDA, 1963). Nas doenças hépato-biliares, as atividades da FA e GGT estão sujeitas a mudanças, sendo que a atividade da GGT é, de longe, a mais sensível (GIBINSKI, SZATON, MARASZEK, 1963; WILLEANDT *et al.*, 1993).

Em nosso estudo obtivemos alguns valores muito elevados de GGT nos grupos que sofreram obstrução biliar, quando comparados ao grupo controle, com uma ampla variação de 2 a 404 u/l (mediana de 55 u/l).

A síntese hepática normal de proteínas depende do suprimento adequado de nutrientes e da integridade orgânica para a síntese. De acordo com ARONSEN (1961), na obstrução biliar crônica, os animais alimentam-se menos, a absorção é provavelmente alterada pela ausência de bile no intestino e há lesão dos hepatócitos, justificando a redução da síntese de albumina. Esse fenômeno também poderia justificar o aumento das gama-globulinas.

No nosso experimento, houve redução significativa da albumina, com tendência à elevação das proteínas totais nos ratos com obstrução biliar (grupo OB), quando comparados aos ratos submetidos à operação simulada (grupo OS).

Na obstrução biliar mantida a ascite se desenvolve, provavelmente, por hipertensão portal e hipoalbuminemia (ARONSEN, 1961). Só três animais com obstrução biliar usados neste experimento apresentaram ascite, diferindo dos resultados obtidos por CAMERON & HASAN (1958); KOUNTOURAS *et al.* (1984) e SANTOS (1993), para os quais a ascite ocorreu em todos os animais estudados. Para o mesmo período de observação de ratos com obstrução biliar, TRAMS & SYMEONIDIS (1957); REICHEN *et al.* (1987); KRÄHENBÜHL *et al.* (1992) e ZIMMERMANN *et al.* (1992), não fazem menção quanto ao desenvolvimento ou não de ascite.

Embora as operações nas vias biliares sejam reconhecidas como fator de risco potencial para o desenvolvimento de colangite (GOLDMAN *et al.*, 1983), no nosso experimento esta foi leve, (59,4%), o que coincide com as observações de MOSCHCOWITZ (1952); JOHNSTONE & LEE (1976); KONTOURAS *et al.* (1984) e SANTOS (1993).

Todos os animais submetidos à obstrução biliar apresentaram dilatação do ducto biliar, com medida do maior eixo variando de 2,0 cm a 8,5 cm. Seu conteúdo tinha aspecto heterogêneo ou era líquido, do tipo seroso, esverdeado ou hemorrágico ou ainda viscoso, amarelo-esbranquiçado, contendo grumos, como descrito por TRAMS & SYMEONIDIS (1957) e CAMERON & HASAN (1958).

As alterações estruturais do fígado decorrentes da obstrução biliar crônica, nem sempre evoluem para a cirrose biliar verdadeira, a qual não é freqüente (GIBSON & ROBERTSON, 1939).

Na colestase mantida, vários são os fatores que podem ser lesivos aos hepatócitos:

1. A retenção de ácidos biliares, lecitina e bilirrubinas, na dependência da velocidade o fluxo biliar, podem refluir para o interior dos hepatócitos, com efeitos tóxicos ao meio intracelular (HOU, REES, SHOTLANDER, 1962; POPPER & SCHAFFNER, 1970; PHILLIPS, POUCELL, ODA, 1986).

2. A queda do fluxo portal, a qual foi demonstrada por MATHIEU *et al.* (1988), sendo atribuída à dilatação intra-hepática dos ductulos biliares, com compressão das vênulas portais, principalmente quando já em regime de baixa pressão (BERGAN, ENGE, HALL, 1974; SOARES, 1991).

3. A isquemia funcional, descrita por BUCKBERG (1977), CASTRO E SILVA JR. *et al.* (1988) e ROSELINO *et al.* (1989). Estes autores sugeriram que na colestase extra-hepática existiria um desequilíbrio entre o suprimento energético, conseqüente à queda do fluxo sanguíneo portal e à alta demanda energética hepática induzida pela sobrecarga de trabalho, na vigência da obstrução biliar (DUBIN & PETERSON, 1958), levando o hepatócito a um estado de isquemia funcional

Em muitas publicações, as alterações histológicas do fígado, consideradas como responsáveis pela hipertensão portal, com eventual esplenomegalia esclero-congestiva, não são detalhadas e não é possível se ter a certeza de que se trate de cirrose biliar verdadeira, bem como não se especificam quais seriam as alterações morfológicas que configurariam aquela situação tida como irreversível (WEINBREN *et al.*, 1985).

Em outras vezes, as alterações hepáticas atribuídas à cirrose biliar secundária, claramente não a representam, pois há descrição e ilustração da manutenção das relações entre o espaço porta e a veia hepática terminal (CAMERON & BUNTON, 1960; WEINBREN *et al.*, 1985).

Nestas situações, o termo mais apropriado seria “fibrose biliar”, embora este não contemple todo o espectro da transformação que ocorre no parênquima hepático (POPPER, 1970; DESMET, 1994; WEINBREN *et al.*, 1985).

WEINBREN *et al.* (1985) definem “fibrose biliar” como um quadro histológico caracterizado por alargamento dos espaços-porta (duas ou mais vezes seu diâmetro normal), com predomínio de colágeno em sua composição, tendo ainda proliferação ductular, infiltrado inflamatório misto e preservação das relações vasculares entre o espaço porta e a veia hepática terminal.

O diagnóstico definitivo de cirrose biliar secundária só deve ser feito quando da presença de alterações estruturais bem definidas, tais como: degeneração parenquimatosa, fibrose e regeneração nodular (GILBSON & ROBERTSON, 1939). De acordo com WEINBREN *et al.* (1985), a terminologia “nódulo” também faria referências a mudanças no padrão normal das relações vasculares entre os ramos da veia hepática terminal e o espaço-porta o que, e acordo com ANTHONY *et al.* (1978), seria fundamental para o diagnóstico de cirrose biliar.

Em relação à proliferação ductal, sempre presente nos casos de obstrução biliar extra-hepática, a irritação química é aventada como fator estimulante, sendo que os efeitos patológicos seriam iniciados pela presença de altas concentrações de sais biliares em contato com a membrana canalicular (SCHAFFNER *et al.*, 1971). Para BUYSENS (1965), a proliferação ductal foi atribuída a fatores intraluminares, sobretudo ao aumento da pressão nos ductos biliares, ou ainda a fatores intersticiais decorrentes da morte de hepatócitos.

SLOTT *et al.* (1990) demonstraram, em ratos com obstrução biliar extra-hepática, que as células ductais proliferadas são originárias do epitélio já existente, e que mantêm suas características. Os ductos biliares proliferam por alongamento e não por brotamento ou alargamento, sendo o aumento da pressão no ducto biliar o principal fator desencadeante para a divisão das células ductais.

Para VAN EYKEN, SCIOT, DESMET (1988), não haveria metaplasia ductular dos hepatócitos, ou uma célula matriz para o crescimento do epitélio biliar em alguma parte do ducto ou no tecido conjuntivo do espaço-portal, como aventado por CARRUTHERS, KALIFAT, STEINER (1962).

KOYAMA *et al.* (1975) observaram correlação positiva entre a quantidade de fibras de reticulina e células ductais proliferadas. A combinação destes achados, associada à escassa necrose de células hepáticas, sugere que a causa da fibrose tenha relação com a proliferação ductal (POPPER & UDENFRIEND, 1970).

As fibras de colágeno do fígado são separadas em 3 frações, de acordo com a atividade metabólica. Em ordem decrescente de atividade metabólica, tem-se o colágeno solúvel neutro, o colágeno solúvel ácido e o mais estável metabolicamente, que é o insolúvel (JACKSON, 1957; CASTRO E SILVA JR. *et al.*, 1998). De acordo com KOYAMA *et al.* (1975), essas frações representam 2,7%, 2,6% e 4,7% do colágeno total do fígado normal em ratos.

KOYAMA *et al.* (1975) observaram que todas as frações de colágeno aumentaram durante obstrução biliar extra-hepática em ratos, sendo que a quantidade de colágeno insolúvel aumenta uma vez após duas semanas de obstrução, 3 vezes após 3 semanas e mais de 6 vezes após 4 semanas.

Na cirrose biliar do homem, além do depósito do tecido fibroso, há também degeneração celular e regeneração, proliferação ductal, infiltrado inflamatório e conexões vasculares anômalas, mas a irreversibilidade está relacionada com a permanência da fibrose. Na cirrose humana, a concentração absoluta e relativa dos vários tipos de colágeno modifica-se e a fibrose hepática é muito heterogênea (ROJKIND & DUNN, 1979). Pode ser composta predominantemente por fibras reticulínicas, como na cirrose da infância ou em alguns casos de cirrose alcoólica, em que nódulos de regeneração pequenos estão presentes e os septos largos de tecido conjuntivo são escassas ou ausentes (PEREZ-TAMAYO, 1958). Por outro lado, a fibrose pode ser constituída por septos grossos ou finos, com fibras de colágeno hialino. Mais freqüentemente, entretanto, a fibrose na cirrose é uma mistura variável da deposição excessiva de fibras reticulínicas e colágenas (POPPER, 1977).

As fibras de reticulina desaparecem, enquanto as fibras de colágeno, que se coram com o tricrômio de Masson, são permanentes (McDONALD & PECHET, 1961).

A irreversibilidade da fibrose é geralmente associada ao aumento da fração insolúvel do colágeno. A formação destas fibras é proeminente após 3 a 4 semanas de obstrução biliar em ratos (KOYAMA *et al.*, 1975); esses autores concluíram que esse seria o ponto crítico do estágio da obstrução biliar em que as mudanças fibróticas do fígado se tornam irreversíveis. Referem ainda que tal fato é constante, já que a maioria dos ratos apresenta cirrose biliar após 3 a 4 semanas de obstrução.

Alterações morfológicas na cirrose biliar secundária, com distorção da arquitetura normal do fígado, ocorre em aproximadamente 80% dos cães, após 6 a 7 semanas de obstrução biliar (WILLENS *et al.*, 1986) e em 50 a 80% dos ratos, após 4 semanas de ligadura biliar (MELZER *et al.*, 1992). As alterações morfológicas são semelhantes àsquelas observadas na cirrose biliar humana (KOUNTOURAS, 1984; WILLENS *et al.*, 1986).

Após 10 dias de obstrução biliar em ratos, o espaço-portal torna-se alargado pela fibrose e proliferação ductal, que na evolução invadem o parênquima hepático, com transformação nodular.

Na análise histológica dos ratos do grupo OB, a fibrose portal apresentou grau leve e moderado em 96,9 % dos animais. A proliferação de ductos foi intensa em 81,2 %. A formação de septos apresentou grau moderado e intenso em 87,4 % e em 68,7 % das biópsias analisadas constatou se formação de nódulos.

A estase biliar, comumente observada após obstrução do ducto biliar, não foi constatada no nosso trabalho. Não houve acúmulo de pigmento biliar (plug biliar) que é clinicamente uma característica de estase biliar. Esta ausência é comum em algumas espécies de animais, como no rato (RIBEIRO, 1999).

A combinação das alterações da arquitetura hepática, associada à presença de nódulos de regeneração difusamente distribuídos pelo parênquima nos permite, portanto, afirmarmos que no nosso experimento, obtivemos um quadro morfológico definido como “fibrose biliar secundária” por McDONALD & PECHET (1961); JOHNSTONE & LEE, (1976); FRANCO *et al.*, (1979); WEINBREN *et al* (1985) e ZIMMERMANN *et al.* (1992) ou de “cirrose atenuada”, como sugerido por CAMERON & PRASAD (1960); irreversível, no entanto, como sugerido por KOYAMA *et al.*, 1975.

Acreditamos que estes sejam também os achados histológicos mais frequentes nos vários modelos descritos de obstrução biliar experimental. Porém, a falta de critérios morfológicos na grande parte das publicações, dificulta uma acurada comparação entre os nossos resultados e os demais. Concordamos com GIBSON & ROBERTSON (1939), que a cirrose biliar secundária seja mesmo rara.

No presente modelo experimental de obstrução biliar, obtivemos a formação de grande número de nódulos circundados por septos fibrosos, na espessura dos quais, havia intensa proliferação ductal. Eventualmente, caso esses animais pudessem ser mantidos vivos por mais tempo, a cirrose biliar secundária pudesse ser observada.

Associando-se às alterações morfológicas observadas, as clínicas e laboratoriais, acreditamos termos desenvolvido um modelo experimental de obstrução biliar prático e seguro, o qual contempla todas as prerrogativas como modelo e que permite, ainda, eventual bloqueio do processo em qualquer momento do experimento.

6. CONCLUSÕES

1. A tração do ducto hepático, sem secção ou ligadura, e com fixação através do apêndice xifóide com o auxílio de cateter, em ratos Wistar adultos promove, ao final de 30 dias, aumento significativo nas dosagens séricas de bilirrubinas totais (BD e BI), aminotransferases (ALT e AST), fosfatase alcalina e gama glutamiltransferase, quando comparados a valores obtidos de ratos submetidos à operação simulada.

2. A análise histológica do fígado de ratos Wistar, realizada após seu sacrifício, 30 dias após terem sido submetidos a esta técnica, mostra graus variáveis de distorção da arquitetura, com presença de “fibrose de padrão biliar” (fibrose portal com formação de septos fibrosos, acompanhada de proliferação ductular marcada) em todos os casos e nódulos regenerativos em 68,7%.

3. Ratos Wistar adultos, 30 dias após terem sido submetidos a esta técnica de obstrução biliar, não exibem, morfológicamente, evolução para cirrose biliar secundária.

4. Ratos Wistar adultos exibem muito boa evolução clínica após serem submetidos a esta técnica cirúrgica, com 83% de sobrevida após 30 dias de cirurgia.

5. A presente técnica, causando a interrupção do fluxo biliar, acompanhada de alterações funcionais e morfológicas hepáticas, associada à boa evolução clínica dos animais pode, portanto, ser utilizada como modelo experimental de obstrução biliar em ratos Wistar adultos.

6. Este modelo experimental oferece excelentes condições de pesquisa, tanto relacionadas à sua fácil técnica cirúrgica, como pela constante facilidade de acesso à via biliar, o que possibilita a interrupção do quadro obstrutivo em qualquer fase evolutiva do experimento.

7. SUMMARY

The purpose of this study was to create an obstruction in the biliary duct using a surgical procedure without ligatures, sectioning, or cannulation that would evolve to chronicity and develop into cirrhosis (or at least standard biliary fibrosis) and also to maintain an easily accessible extra-hepatic biliary route. The histopathologic assessment of the liver and the biochemical effects on the serum were conducted 30 days after obstruction.

This study was conducted on 63 Wistar rats, which were divided into 3 groups: 47 animals underwent a common obstruction of the hepatic duct (OB), 9 underwent a simulated surgery (OS) and 7 were used as the control group for histologic analysis (OC).

The surgical technique used isolated the hepatic duct as it emerged near the pancreas with polypropylene thread, leaving 1cm of the duct free. The xiphoid appendix was then exposed and using the rat's ear marker a small orifice was made in it. The polypropylene thread attached to the biliary duct was then drawn through this orifice forming a biliary duct sling above the xiphoid appendix and a silicon catheter was then placed in it. It therefore remained stretched and exposed between the musculature and skin. The muscle wall and skin were closed with continuous sutures.

The total number of rats in the OB group diminished by fifteen (32%): 8 rats suffered an early death and 7 rats died as a result of a technical error (in 4 cases, the catheter was not correctly placed and in 3 cases, the bile duct ruptured). The remaining 32 rats in the OB group when compared to those in the OS group presented a significant increase in the dosage of bilirubin, aminotransferases (ALT & AST), alkaline phosphatase and gammaglutamiltransferase with a reduction in albumin. The histologic analysis confirmed the development of "standard biliary fibrosis" in all the OB group cases and the formation of regenerative nodules in 68.7% of the group. "Standard biliary fibrosis" was characterized by portal fibrosis (slight to moderate) in 96.8% of the cases with the formation of fibrous septa (moderate to intense) in 87.4% of the cases, together with an intense proliferation of the biliary ducts in 81.2% of the cases and in 18.7% the proliferation was moderate.

An alternate experimental model that was simple and efficient was developed and as it was easy to manipulate the obstruction provoked by traction of the biliary duct, excellent research conditions were provided right from the moment the biliary flux was interrupted up to the development of cholestase and the distortion of the hepatic structure . This model also permits an interruption of the biliary obstruction and a study of the sequels caused by obstructive icterus.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBRUZZESE, A & JEFFERY, R.L. - Marked elevations of serum glutamic oxalacetic transaminase and lactic dehydrogenase activity in chronic extrahepatic biliary disease. **Am. J. Dig. Dis.**, 14:332-338, 1969.
- ACCATINO, L.; CONTRERAS, A.; FERNANDEZ, S.; QUINTANA, C.- The effect of complete biliary obstruction on bile flow and bile acid excretion: postcholestatic choleresis in the rat. **J. Lab. Clin. Med.**, 93:706-717, 1979.
- ADSON, M.A & WYCHULIS, A.R. - Portal hypertension in secondary biliary cirrhosis. **Arch. Surg.**, 96:604- 612, 1968.
- ANTONY, P.P.; ISHAK, K.G.; NAYAK, N.C.; POULSEN, H.E.; SCHEUER, P.J.; SOBIN, L.H. - The morphology of cirrhosis. **J.Clin. Pathol.**, 31:395-414, 1978.
- ARONSEN, K.F. - Liver function studies during and after complete extra- hepatic biliary obstruction in the dog. **Acta Chir. Scand.**, 275:5-114, 1961. Supplement.
- BACQ, Y.; ROULOT, D.; BRAILLON, A.; LEBREC, D. - Hemodynamic effects of dopamine in conscious rats with secondary biliary cirrhosis. **J. Hepatol.**, 11:257-262, 1990.
- BERGAN, A.; ENGE, I.; HALL, C. - Angiographic studies in experimental total and lobar cholestasis in dogs. **Invest. Radiol.**, 9:642- 72, 1974.
- BOMZON, A.; ROSENBERG, M.; GALI, D.; BINAH, O.; MORDECHOVITZ, D.; BETTER, O.S.; GREIG, P.D.; BLENDIS, L.M. -Systemic hypotension and decreased pressor response in dogs with chronic bile duct ligation. **Hepatology**, 6:595-600.1986.
- BOSCH, J.; ENRIQUEZ, R.; GROSZMANN, R.J; STORER, E.H. - Chronic bile duct ligation in the dog: hemodynamic characterization of a portal hypertensive model. **Hepatology**, 3:1002-7, 1983.
- BUCKBERG, G.D. -Left ventricular subendocardial necrosis. **Ann. Thorac. Surg.**, 24:379-93, 1977.

- BUNTON, G.L & CAMERON, R. - Regeneration of liver after biliary cirrhosis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 111: 412-21, 1963.
- BUYSENS, N. - Ductular proliferation. **Gastroenterology**, 49:702-6, 1965.
- CAMERON, R & BUNTON, G.L. - Congenital biliary atresia. **Br. Med. J.**, 2: 1253- 7, 1960.
- CAMERON, G.R & HASAN, S.M . - Disturbances of structure and function in the liver as the result of biliary obstruction. **J. Pathol. Bacteriol.**, 75:333-49, 1958.
- CAMERON, G.R & PRASAD, L.B.M. - Recovery from biliary obstruction after spontaneous restoration of the obstructed common bile-duct. **J. Pathol. Bacteriol.**, 80:127-36, 1960.
- CARRUTHERS, J.S.; KALIFAT, S.R. STEINER, J.W. - The ductular cell reaction of rat liver in extrahepatic cholestasis - II.: The proliferation of connective tissue. **Exp. Mol. Pathol.**, 1:377-96, 1962.
- CASTRO E SILVA JR., O & MAZZETO, S.A. - Uma nova técnica operatória para indução experimental de cirrose biliar secundária. **Acta Cir. Bras.**, 6: 42, 1991. Suplemento.
- CASTRO E SILVA JR., O.; MAZZETO, M.S.A.; SOUZA, M.E.J.; PICINATO, M.A.N.C.; SANKARANKUTTY, A K. - Obstrução biliar extra hepática. In: CASTRO E SILVA JR, O.C.; ZUCOLOTO, S; BEER JR, A., ed. **Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia**. São Paulo, 1998. p.191-200.
- COLE, W.H.; IRENEUS, C.; REYNOLDS, J.T. - Strictures of the common bile duct. **Ann. Surg.**, 142: 537-51, 1955.
- COBEA (COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL) --**Princípios Éticos na Experimentação Animal**. Boletim Informativo São Paulo, 1991.
- CONOVER, W.J. - **Practical nonparametric statistics**. In: _____ ed. New York, John Wiley & Sons, 1971. 462p.

- COTRAN, R.S.; KOMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Patologia estrutural e funcional**. 4. ed. In: _____ ed. **Fígado e vias biliares**. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, p.1991. 749-807.
- DESMET, V.F. Cholestasis: extrahepatic obstruction and secondary biliary cirrhosis. In: McsSCHEUR, R.N.M.; ANTONY., SCHEUER, P.J.; BURT, A.D.; PORTMANN, B.C. ed. **Pathology of The Liver**. 3. ed. Ednburg, Churchill livinstone, 1994. p.425-475.
- DIAMOND, T.; DOLAN, S.; THOMPSON, R.L.E.; ROWLANDS, B.J. -Development and reversal of endotoxemia and endotoxin-related death in obstructive jaundice. **Surgery**, **108**:370-5, 1990.
- DUBIN, I.N & PETERSON, L.H. - An explanation for the centrolobular localization of intrahepatic bile stasis in acute liver diseases. **Am. J. Med. Sci.**, **236**:45-52, 1958.
- EDLUND, Y. - Studies on the carbobydrate metabolism and liver protection therapy in experimental extrahepatic biliary obstruction **Acta Chir. Scand.**, **96**:1- 187, 1948. Supplement 136.
- ESCANHOELA, C.A.F & VALENÇA JR., T. - Desafios na interpretação das biópsias de fígado (relacionados às doenças colestáticas devido a distúrbios da árvore biliar). In: **Curso de Atualização em Patologia Cirúrgica**. D.A.P-1988.p.84-93.
- FRANCO, D.; GIGOU, M.; SZEKELY, A.M.; BISMUTH, H. - Portal hypertension after bile duct obstruction. **Arch. Surg.**, **114**:1064-7, 1979.
- GIBINSKI, K.; SZATON, R.; MARASZEK, J. - Evaluation of gamaglutamyltranspeptidase (GGT) and leycylaminopeptidase (LAP) determinations in internal disease. **Gastroenterology**, **99**:237-46, 1963.
- GIBSON, W.R & ROBERTSON, H.E. - So-called biliary cirrhosis. **Arch. Pathol.**, **28**:37-48, 1939.
- GOLDMAN, L.D.; STEER, M.L.; SILEN, W. - Recurrent cholangitis after biliary surgery. **Am. J. Surg.**, **145**:450-4, 1983.

- GROSS JR., J.B.; REICHEIN, J.; ZELTNER, T.B.; ZIMERMANN, A.- The evolution of changes in quantitative live function teste in a rat model of biliary cirrhosis:correlation with morphometric mesurement of hepatocyte mass. **Hepatology**, 7:457- 463, 1987.
- HATOFF, D.E.; TOYOTA, N.; WONG, C.; MILLER, A.L.; TAKEYA, M.; MIYAL, K. - Rat liver alkaline phosphatases: evidence hepatocyte and portal triad enzymes differ. **Dig. Dis. Sci.**, 30: 564-72, 1985.
- HOLMBERG, J.T.; HEDERSTROM, E.; IHSE, I. - A method to prevent recanalization of the transected bile duct in the rat. **Scan . J. Gastroenterol.**, 20:428- 432, 1985.
- HOU, C.T.; REES, K.R.; SHOTLANDER, V.L. - A mechanism of liver necrosis after biliary obstruction in the rat. **J. Pathol. Bacteriol.**, 83:469-73, 1962.
- JACKSON, D.S. – Conective tissue growth stimulated by carrageenin. **Biochem. J.**, 65:277-84. 1957.
- JOHNSTONE, J.M.S & LEE, E.G. - A quantitative assessment of the structural changes in the rat's liver following obstruction of the common bile duct. **Br. J. Exp. Pathol.**, 57:85-94, 1976.
- KAPLAN, M.M & RIGHETTI, A. - Induction of rat liver alkaline phosphatase: the mechanism of the serum elevation in bile duct obstruction. **J. Clin. Invest.**, 49:508-16, 1970.
- KAPLAN, M.M; KANEL,G.C; SINGER, J.A. - Enzyme changes and mophometric analysis of bile ducts in experimental bile duct obstruction. **Clin. Chem. Acta.**, 99:113-119, 1979.
- KOCK-WESER, D.; MEYER, K.A.; YESINICK, C.; POPPER, H. -Influence of the site of experimental biliary obstruction upon functional and morphologic hepatic injury. **Lab. Investigation**, 1:324-31, 1952.

- KOUNTOURAS, J.; BILLING, B.H.; SCHEUER, P.J. - Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for cirrhosis in the rat. **Br. J. Exp. Pathol.**, **65**:305-11, 1984.
- KOUNTOURAS, J.; SCHEUER, P.J.; BILLING, B.H. - Effect of prolonged bile duct obstruction in the rat on hepatic transport of biliurbin. **Clin. Sci.**, **68**:341-347, 1985.
- KOYAMA, K.; MUITO, I.; YAMAUCHI, H.; TAKAGI, Y.; ANEZAKI, T.; SATO, T. - Biochemical study of fibrosis in the rat liver in biliary obstruction. **Tohoku J. Exp. Med.**, **116**:176-72, 1975.
- KOYAMA, K.; TAGI, Y.; ITO, K.; SATO, T. - Experimental and clinical studies on the effect of biliary drainage in obstructive jaundice. **Am. J. Surg.**, **142**:293-9, 1981.
- KRÄHENBÜHL, S.; STUCKI, J.; REICHEN, J. - Reduced activity of the electron transport chain in liver mitochondria isolated from rats with secondary biliary cirrhosis. **Hepatology**, **15**:1160-6, 1992.
- KRÄHENBÜHL, S.; KRÄHENBÜHL GLAUSER, S.; STUCKI, J.; GEHR, P.; REICHEN, J. - Stereological and functional analysis of liver mitochondria from rats with secondary biliary cirrhosis: impaired mitochondrial metabolism and increased mitochondrial content per hepatocyte. **Hepatology**, **15**:1167-72, 1992.
- LEE, R.G. Cholestasis and biliary obstruction. In: _____ ed. **Diagnostic liver pathology**. St. Louis, Mosby, 1994. p.82- 107.
- LEEVY, C.M.; DVORSCHAK, C.K.; GNASSI, A.M. -The liver in extrahepatic biliary obstruction. **Am. J. Med. Sci.**, **227**:272-8, 1954.
- MCDONALD, R.A & PECHET, G. - Liver cell regeneration due to biliary obstruction. **Arch. Pathol.**, **72**:133-41, 1961.
- MATHIEU, R.T.; NAGORNEY, D.M.; ROCHESTER, M.D.; LEWIS, M.H.; BLUNGART, L.H. - Hepatic hemodynamics after chronic obstruction of the biliary tract in the dog. **Surg. Gynecol. Obstet.**, **166**:125-30, 1988.

- MAZZETO, S.A & CASTRO E SILVA JR., O. - Descrição de uma nova técnica cirúrgica para obstrução biliar extra- hepática. **Acta. Cir. Bras.**, 4:32-3, 1989.
- MEDEIROS, M.V. M. J. P.; FREITAS, L.A.R.; ANDRADE, Z.A. - Difference in hepatic pathology resulting from bile duct obstruction in young and old rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 21:75-83, 1988.
- MOSCHCOWITZ, E.- Morphology and pathogenesis of biliary cirrhosis. **Arch. Pathol.**, 54:259-75, 1952.
- MELZER, E.; KREPEL, Z.; RONEN, I.; BAR-MEIR, S. - Recovery of hepatic clearance and extraction following a release of common bile duct obstruction in the rat. **Res Exp. Med.**, 192:35-40, 1992.
- OHLSSON, E.G.; RUTHERFORD, R.B.; BOITNOTT, J.K.; HAALEBOS, M.M.P.; ZUIDEMA, G.D. - Changes in portal circulation after biliary obstruction in dogs. **Am. J. Surg.**, 120:16-22, 1970.
- PATWARDHAN, R.V.; SMITH,O.J.; FARMELANT, M.H. - Serum transaminase levels and cholescintigraphic abnormalities in acute biliary tract obstruction. **Arch. Intern. Med.**, 147:1249-53, 1987.
- PEREZ-TAMAYO, R – Cirrhosis of the liver: Reversible disease? **Pathol. Ann.**, 14:183-213, 1979.
- PEREZ-TAMAYO, R - Diffuse interstitial cirrhosis. **Am. J. Clin. Pathol**, 29: 226-35, 1958.
- PHILLIPS, M.J.; POUCELL, S.; ODA, M. - Biology of disease mechanism of cholestasis. **Lab. Invest.**, 54:593-608, 1986.
- POPPER, H. - Pathologic aspectos of cirrhosis. **Am. J. Pathol.**, 87:228-58, 1977.
- POPPER, H & ORR, W. - Current concepts in cirrhosis. **Scand. J. Gastroenterol**, 6:203-22, 1970. Supplement.

- POPPER, H & SCHAFFNER, F. - Pathophysiology of cholestasis. **Human Pathology** 1:1-24, 1970.
- POPPER, H & UDENFRIEND, S. - Hepatic fibrosis.. **Am. J. Med.**, 49:707-21, 1970.
- POSNER, M.C.; BURT, M.E.; STONE, M.D.; HAN, B.L.; WARREN, R.S.; VYDELINGUM, N.A.; BRENNAN, M.F. - A model of reversible obstructive jaundice in the rat. **J. Surgical Research.**, 48:204-210, 1990.
- POULSEN, H & CHRISTOFFERSEN, P. -- Histological changes in liver from patients with surgical bile duct disorders. **Acta Pathol. Microbiol. Scand.**, 78:571-9, 1970.
- REICHEN, J.; EGGER, B.; OHARA, N.; ZELTNER, T.B.; ZYSSET, T.; ZIMMERMANN, A. - Determinants of hepatic function in liver cirrhosis in the rat. **J. Clin. Invest.**, 82:2069-2076, 1988.
- RIBEIRO, A. F - **Esvaziamento Gástrico de líquidos em ratos submetidos à ligadura do ducto biliar.** Campinas, 1999. (Tese - doutorado - Faculdade de Ciências Médica da Universidade Estadual de Campinas Unicamp, São Paulo).
- ROJKIND, M & DUNN, M.A. - Hepatic fibrosis. **Gastroenterology**, 76:849-63, 1979.
- ROSELINO, J.E.S.; CASTRO E SILVA JR., O.; ROMANELLO, L.M.F.; CENEVIVA, R. Effect of cholorpromazine and biliary drainage on portal blood flow and mitochondrial function during extrahepatic cholestasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, 22:889-93, 1989.
- RUTENBURG, A.M.; GOLDBARG, J.A; PINEDA, E.P. - Serum gama-glutamyl-transpeptidase activity in hepatobiliary pancreatic disease. **Gastroenterology**, 45:43-8, 1963.
- SANTOS, J.S. – **Evolução da cirrose biliar secundária após derivação bílioduodenal em ratos.** Ribeirão Preto, 1993. (Tese - Mestrado - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo)

- SANTOS, J.S.; ZUCOLOTO, S.; CASTRO E SILVA, O JR.; SALGADO, JR W.; CENEVIVA, R - Cirrose biliar secundária. In: CASTRO E SILVA JR, O.C.; ZUCOLOTO, S; BEER JR, A., ed. **Modelos experimentais de pesquisa em cirurgia**. São Paulo, 1998. p.191-200.
- SOARES, A.F. **Alterações bioquímicas e morfológicas decorrentes da ligadura da artéria hepática própria na colestase extra-hepática: estudo experimental em ratos**. Ribeirão Preto, 1991.(Tese - Mestrado -Faculdade de Medicina de Riberão Preto, Universidade de São Paulo)
- SCHAFFNER, F.; BACCHIN, P.G.; HUTTERER, F.; SCHARNBECK, H.H.; SARKOZI, L.L.; DENK, H.; POPPER H. - Mechanism of cholestasis structural and biochemical changes in the liver and serum in rats after bile duct ligation. **Gastroenterology**, **60**:888-97, 1971.
- SCOBIE, B.A & SUMMERSKILL, W.H.J. - Hepatic cirrhosis secondary to obstruction of the biliary system. **Am. J. Dig. Dis.**, **10**:135- 46, 1965.
- SCOTT-CONNER & GROGAN, J.B. – Serum and cellular factors in murine obstructive jaundice. **Surgery**, **115**:77- 84, 1994.
- SEDGWICK, C.E.; POULANTZAS, J.K.; KUNE, G.A. Management of portal hypertension secondary to bile duct strictures. **Ann. Surg.**, **163**:949-53, 1966.
- SHERLOCK, S. **Diseases of the Liver and Biliary System**, 5. ed - London. 1975. 821p.
- SLOTT, P.A.; LIU, M.H.; TAVOLONI, N. - Origin, pattern, and mechanism of bile duct proliferation following biliary obstruction in the rat. **Gastroenterology**, **99**:466-77, 1990.
- SZASZ, G. A kinetic photometric method for serum γ - glutamyl transpeptidase. **Clin. Chim.**, **15**:124-36, 1969.

- TRAMS, E.G & SYMEONIDIS, A .- Morphologic and functional changes in the livers of rats after ligation or excision of the common bile duct. **Am. J. Pathology**, **33**:13-25, 1957.
- VAN-EYKEN, P.; SCIOT, R.; DESMET, V. - Intrahepatic bile duct development in the rat: acytokeration- immunohistochemical study. **Lab. Invest.**, **59**:52-9, 1988.
- VITAL, A.; BIOULAC-SAGE, P.; IRON, A; BALABAUD, C.H. - Morphologic structure of bile canaliculi after bile duct ligation in the rat:a time- course study. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **106**:464-467, 1982.
- WAY, L.W.; BERNHOFT, R.A.; THOMAS, M.J. - Biliary structure. **Surg. Clin.**, **61**:963-72, 1981.
- WEINBREN, K.; HADJIS, N.S.; BLUMGART, L. H - Structural aspects of the liver in patients with biliary disease and portal hypertension. **J. Clin. Pathol.**, **38**:1013-1020, 1985.
- WEISS, J.S.; GAUTAM, A.; LAUFF, J.J.; SUNDBERG, M.W.; JATLOW, P.; BOYER, J.L.; SELIGSON, D. - The clinical importance of a protein-bound fraction of serum bilirubin in patients with hyperbilirubinemia. **N. Engl. J. Med.**, **309**:147-50, 1983.
- WIELANDT, A.M.; PIZARRO, M.; SOLIS, N.; ARRESE, M.; ACCATINO, L. - Postcholestatic alkaline phosphatase activity after relief of bile duct obstruction in the rat. **Hepatology**, **18**:179-186, 1993.
- WILLENS, B.; VILLENEUVE, J.P.; HUET, P.M. - Effect of propranolol on hepatic and systemic hemodynamics in dogs with chronic bile duct ligation. **Hepatology**, **6**:92-96, 1986.
- WOOTTON, A.M.; NEALE, G.; MOSS, D.W. - Enzyme activities of cells of different types isolated from livers of normal and cholestatic rats. **Clin. Sci. Mol. Med.**, **52**:585-90, 1977.

WRIGHT, J.E & BRAITHWAITE, J.L. - Collateral biliary channels. **Nature**, 195:95-6, 1962.

ZIMMERMANN, H.; REICHEN, J.; ZIMMERMANN, A.; SÄGESSER, H.; THENISCH, B.; HÖFLIN, F. - Reversibility of. secondary biliary fibrosis by biliodigestive anastomosis in the rat. **Gastroenterology**, 103:579-589, 1992.

ZIMMERMANN, H.; BLASER, H.; ZIMMERMANN, A.; REICHEN, J. -Effect of development on the fuctional and histological changes induced by bile-duct Ligation in the rat. **J. Hepatol.**, 20:231-39, 1994.

Obs: As referências bibliográficas foram organizadas de acordo com: BIREME-CENTRO-LATINO-AMERICANO DE INFORMAÇÕES EM CIÊNCIAS DA SAÚDE - Normas para a apresentação de dissertações e teses, São Paulo. BIREME, 1990. 32p.

9. ANEXOS

Valores do peso individual dos ratos do grupo com obstrução biliar (OB) antes e após 30 dias, expressos em gramas

Rato	Peso inicial	Peso final
1	330	333
2	340	332
3	290	295
4	325	326
5	275	265
6	285	294
7	300	295
8	295	316
9	270	264
10	296	297
11	300	295
12	340	340
13	320	345
14	265	245
15	270	260
16	257	256
17	323	344
18	254	294
19	302	321
20	290	366
21	309	356
22	284	241
23	289	323
24	309	365
25	333	342
26	323	328
27	335	303
28	332	331
29	295	278
30	344	324
31	281	285
32	330	332
Média	300	304

Valores do peso individual dos ratos do grupo operação simulada (OS) antes após 30 dias, expressos em gramas.

Rato	Peso Inicial	Peso Final
1	329	379
2	355	379
3	303	327
4	355	379
5	296	330
6	253	270
7	276	292
8	340	379
9	331	355
Média	298	345

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Valores do peso individual dos ratos do grupo controle (CO) antes e após 30 dias, expressos em gramas.

Rato	Peso Inicial	Peso Final
1	319	363
2	279	335
3	317	376
4	256	309
5	329	390
6	341	415
7	317	363
Média	315	343

Valores individuais e das medianas das dosagens séricas da alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamilttransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), proteína total (PT), albumina (ALB), bilirrubina total (BT), bilirrubina direta (BD) e bilirrubina indireta (BI) dos ratos submetidos à obstrução biliar (grupo OB)

Rato	ALT	AST	GGT	FA	PROT	ALB	BT	BD	BI
	U/l	U/l	U/l	U/l	g/dl	g/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl
1	430	1042	404	524	7,05	2,29	12,2	7,2	1,8
2	213	646		736	6,75	2,50	10,4	8,7	3,2
3	150	495	127	483	6,55	2,40	10,9	12,2	2,3
4	169	410	55	279	6,16	1,98	15,0	8,7	2,8
5	169	510	140	631	6,50	2,70	11,6	7,4	2,9
6	237	606	99	610	4,90	2,23	9,3	6,5	1,8
7	107	312	71	481	6,40	2,16	8,2	5,3	1,6
8	157	432	68	717	4,30	2,36	6,2	-	-
9	154	372	47	586	7,06	2,40	7,9	-	-
10	43	304	80	236	5,40	1,54	9,8	-	-
11	88	172	2	117	7,23	2,98	0,7	-	-
12	141	372	6	416	7,33	2,64	2,8	-	-
13	92	294	3	270	7,06	2,46	1,3	-	-
14	94	285	3	267	6,91	2,44	1,4	-	-
15	222	917	36	538	7,15	1,71	7,7	-	-
16	226	855	36	549	7,04	1,69	8,4		-
17	304	912	55	700	7,14	2,05	8,3	-	-
Mediana	157	432	055	524	6,91	2,36	8,24	7,38	2,26

Valores individuais e das medianas das dosagens séricas da alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamilttransferase (GGT), fosfatase alcalina (FA), proteína total (PT), albumina (ALB), bilirrubina total (BT), bilirrubina direta (BD) e bilirrubina indireta (BI) dos ratos submetidos à operação simulada (grupo OS)

Rato	ALT	AST	FA	GGT	PROT	ALB	BT	BD	BI
	U/l	U/l	U/l	U/l	g/dl	g/dl	mg/dl	mg/dl	mg/dl
1	38	80	96	1,0	6,86	3,13	0,14	0,65	0,01
2	46	143	68	0	6,90	3,08	0,15	0,25	0,01
3	55	140	76	11	6,55	3,06	0,19	0,44	0,03
4	46	144	58	9,0	6,78	3,02	0,19	0,42	0,06
5	43	162	94	0	6,53	3,13	0,22	0,42	0,06
6	38	78	94	0	6,82	3,01	0,22	0,50	0,06
7	46	192	97	2,0	6,63	2,64	0,22	0,29	0,14
8	47	112	82	1,0	6,48	3,05	-	-	-
9	38	104	97	3,0	6,79	3,10	-	-	-
Mediana	46	140	94	1,0	6,78	3,06	0,22	0,42	0,06

Medidas de posição e dispersão das variáveis por grupo.

GRUPO OPERAÇÃO SIMULADA

Variável	N	Média	Desvio-padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
ALT	9	44.11111	5.60010	46.00000	38.00000	55.00000
AST	9	128.33333	37.93415	140.00000	78.00000	192.00000
GGT	9	3.00000	4.12311	1.00000	0	11.00000
FA	9	84.66667	14.48275	94.00000	58.00000	97.00000
PROT	9	6.70444	0.15773	6.78000	6.48000	6.90000
ALB	9	3.01333	0.14526	3.05000	2.64000	3.13000
BT	9	0.14778	0.08871	0.19000	0	0.22000
BD	9	0.33000	0.21949	0.42000	0	0.65000
BI	9	0.04111	0.04512	0.03000	0	0.14000
PESO I	9	298.00000	26.88866	303.00000	256.00000	329.00000
PESO F	9	345.22222	27.41705	345.00000	308.00000	379.00000

GRUPO OBSTRUÇÃO BILIAR

Variável	N	Média	Desvio-padrão	Mediana	Mínimo	Máximo
ALT	17	176.11765	92.79674	157.00000	43.00000	430.00000
AST	17	525.64706	262.25154	432.00000	172.00000	1042
GGT	17	75.70588	93.97856	55.00000	2.00000	404.00000
FA	17	478.82353	186.47394	524.00000	117.00000	736.00000
PROT	17	6.52529	0.87439	6.91000	4.30000	7.33000
ALB	17	2.26647	0.38038	2.36000	1.54000	2.98000
BT	17	7.77059	4.10956	8.30000	0.70000	15.00000
BD	7	8.00000	2.20454	7.40000	5.30000	12.20000
BI	7	2.34286	0.63208	2.30000	1.60000	3.20000
PESO I	32	300.59375	24.79055	296.00000	254.00000	340.00000
PESO F	32	304.25000	36.68963	300.00000	226.00000	366.00000
Ø DUCTO	32	4.41875	1.66761	4.50000	2.00000	8.50000

Níveis descritivos dos testes de Mann-Whitney para comparação das variáveis entre os grupos.

Variável	p –valor
ALT	0.0001
AST	0.0001
GGT	0.0004
FA	0.0001
PROT	0.5352
ALB	0.0001
BT	0.0001
BD	0.0010
BI	0.0010
PESO I	0.7260
PESO F	0.0592

Composição básica da ração

Milho	Farelo de Arroz Cru
Farelo de Trigo	Carbonato de Calcio
Farelo de Soja	Fosfato Bicálcico
Farinha de Carne	Sal

Enriquecimento por quilograma de produto

Vitamina A - 20.000 UI	Piridoxina – 6 mg
Vitamina D3 - 6.600 UI	Biotina – 0,1 mg
Vitamina E - 30 UI	Ácido Fólico – 0,5 mg
Vitamina K – 6 mg	Manganês 50 mg
Vitamina B 12 – 10 mcg	Iodo – 2 mg
Vitamina B2 – 8 mg	Ferro – 65 mg
Pantotenato de Cálcio – 24 mg	Zinco – 35 mg
Niacinina – 95 mg	Cobre – 36 mg
Tiamina – 4 mg	Antioxidante – 100 mg
Colina – 2.000 mg	

Níveis de garantia

Umidade – 13 % (máximo)
Proteínas – 23% (máximo)
Extrato Etéreo – 2,5 % (máximo)
Matéria Fibrosa – 8,0 % (máximo)
Cálcio – 1,8 % (máximo)
Fósforo – 0,8 % (mínimo)

*** NUTRIMENTOS PURINA LTDA**