



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Valesca Oliveira de Sousa

**Regeneração do autoimplante esplênico em ratos: avaliação
morfofuncional e imuno-histoquímica**

Rio de Janeiro

2011

Valesca Oliveira de Sousa

Regeneração do autoimplante esplênico em ratos: avaliação morfofuncional e imuno-histoquímica

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Técnica Operatória e Cirurgia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Ruy Garcia Marques

Coorientador: Prof. Dr. Jorge José de Carvalho

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S725 Sousa, Valesca Oliveira de.

Regeneração do autoimplante esplênico em ratos: avaliação morfofuncional e imuno-histoquímica /. Valesca Oliveira de Sousa - 2011.

63 f.

Orientador: Ruy Garcia Marques.

Coorientador: Jorge José de Carvalho

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas, Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas.

1. Baço - Cirurgia - Teses. 2. Baço - Transplante - Teses. 3. Regeneração (Biologia) - Teses. 4. Baço - Anatomia e fisiologia. 5. Esplenectomia. 6. Ratos Wistar. I. Marques, Ruy Garcia. II. Carvalho, Jorge José de. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

CDU 616.411-089

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Valesca Oliveira de Sousa

Regeneração do autoimplante esplênico em ratos: avaliação morfofuncional e imuno-histoquímica

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas, da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Técnica Operatória e Cirurgia Experimental.

Aprovada em 04 de julho de 2011.

Orientador:

Prof. Dr. Ruy Garcia Marques
Universidade do Estado do Rio de Janeiro - UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Jorge José de Carvalho (Coorientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Prof. Dr. Paulo de Assis Melo
Instituto de Farmacologia – UFRJ

Prof.^a Dra. Ana Carolina Stumbo
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2011

DEDICATÓRIA

Ao meu marido, José Rogério Moura de Almeida Neto, e a meus pais,
pelo amor, carinho e por tudo que sou.
Ao José Rogério Moura de Almeida Filho,
pelo incentivo e confiança.

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela modesta consciência que adquiri ao longo desta caminhada, que, sem o seu consentimento, nada deste trabalho teria sido realizado.

Aos professores Ruy Garcia Marques e Jorge José de Carvalho, pela paciência, orientação e incentivo, tornando possível a efetivação deste trabalho.

Aos amigos veterinários Carlos Eduardo Rodrigues Caetano e Érica Lima, pela disponibilidade e ajuda indispensável nas horas que precisei.

À professora Síria Jorge da Fonseca, pelo grande incentivo e contribuição na minha vida profissional.

A Ana Lúcia Rosa Nascimento, uma grande amiga que muito contribuiu para a realização deste trabalho, me ensinando as rotinas e procedimentos histológicos do Laboratório de Ultraestrutura e Biologia tecidual.

A todos os amigos do Departamento de Histologia e Embriologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ – Alyne Félix, Moyses Sant’anna, Érica, Verônica Mattos e Polyana.

Aos funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia da Faculdade de Ciências Médicas da UERJ – Josefa Alves, Angélica Alves, Alan César, Jéssica Flaneto e Kátia Lima.

Aos meus amigos Vinícius Rocha e Rodrigo Neto Ferreira, pela ajuda nos momentos difíceis.

Às grandes amigas Maria Bernadette, Mariana Gonçalves e Angélica Beatriz Pinto, que prestaram grande auxílio nos momentos que mais precisei – obrigado, meninas. Agradeço a DEUS por ter sido abençoado com grandes e sinceras amigas.

Aos meus amigos da Fundação Educacional Dom André Arcoverde.

E a todos que de alguma forma, mesmo não citados aqui, contribuíram para a realização deste trabalho.

O homem é a soma de seus inúmeros ancestrais
e, profissionalmente, é a síntese
de seus muitos mestres.

Bhask

RESUMO

SOUSA, Valesca Oliveira de. *Regeneração do autoimplante esplênico em ratos: avaliação morfofuncional e imuno-histoquímica*. 2011. 63f. Dissertação (Mestrado em Fisiopatologia e Ciências Cirúrgicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

Diante da importância do baço, deve-se tentar a sua preservação sempre que possível e, nas situações em que a esplenectomia total é inevitável, a única alternativa para a preservação de sua função parece ser a realização do autoimplante esplênico. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi analisar o desenvolvimento da regeneração morfológica do tecido autoimplantado, sob microscopia de luz e por imunomarcção, e avaliar a regeneração funcional, por meio da depuração dos corpúsculos de Howell-Jolly, em ratos submetidos a esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico. Foram utilizados 112 ratos *Wistar* albinos machos adultos, distribuídos aleatoriamente em 16 grupos. Semanalmente, durante 16 semanas, os sete animais de cada grupo foram submetidos a coleta sanguínea, sendo preparadas lâminas para avaliação da presença de corpúsculos de Howell-Jolly (avaliação funcional), que estiveram presentes durante as 15 primeiras semanas, sendo que, a partir da oitava semana, houve uma diminuição significativa, mas somente não foram mais identificados na 16ª semana. Em seguida à coleta sanguínea, os animais correspondentes a cada semana foram mortos por sobredose anestésica e submetidos a relaparotomia para retirada do tecido esplênico autoimplantado regenerado. Posteriormente, esse tecido regenerado foi analisado sob microscopia de luz, onde, sob coloração de hematoxilina-eosina, observou-se regeneração morfológica completa do tecido autoimplantado a partir da oitava semana, sendo encontrado um tecido morfológicamente idêntico ao baço normal. Com a técnica de resorcina-fucsina de Weigert, identificaram-se fibras do sistema elástico, demonstrando elastogênese intensa no processo de regeneração do tecido esplênico autoimplantado. Na imunomarcção com antígeno de proliferação celular nuclear (PCNA), observou-se proliferação celular, evidenciando uma expressão gradativa das células a partir da 2ª semana, sendo que, nas 9ª e 10ª semanas, observou-se aumento significativo na imunodensidade, quando comparadas às demais, o que não ocorreu com a técnica para caspase-3, onde a apoptose mais intensa ocorreu nas primeiras semanas. Nossos resultados mostram que, com oito semanas, existe regeneração morfológica do autoimplante esplênico, assemelhando-se a um baço normal, no mesmo momento em que parece iniciar-se a sua regeneração funcional.

Palavras-chaves: Autoimplante. Baço. Regeneração. Corpúsculo de Howell-Jolly.

ABSTRACT

Given the importance of the spleen, it should be preserved whenever possible. If splenectomy is crucial, the only alternative to preserve spleen function is to perform a splenic auto-implantation. The aim of the present study was to assess the morphological regeneration of an auto-implanted spleen and to correlate it to its functional regeneration in a model of splenectomy combined with splenic auto-implantation in rats. Three-month old male Wistar rats (n=112) were randomly allocated into 16 groups (n=7). During 16 weeks, blood was collected to evaluate the presence of Howell-Jolly bodies (functional evaluation). These structures were found during the 15 first weeks, but decreased progressively starting at the 8th week, and were no longer found at the 16th week. In each specific week, after blood collection, rats were killed by anesthetic overdose and subjected to relaparotomy in order to retrieve the regenerated auto-implanted splenic tissue. The tissue was stained by hematoxylin and eosin and analyzed under the light microscope. Full morphological regeneration of the auto-implanted tissue was seen at the 8th week. Intense elastogenesis was detected by the Weigert resorcin-fuchsin stain during regeneration. Cell proliferation was increased starting at the 2nd week, and the highest density was seen at the 9th and 10th weeks (assessed by the immunohistochemistry of the proliferating cell nuclear antigen [PCNA]). Caspase-3 stain indicated higher apoptosis at the first weeks of experiment. The present data show that there is a morphological regeneration of the splenic auto-implant after 8 weeks of implantation, resulting in a morphologically healthy spleen, and it matches the initiation of the functional regeneration.

Key-words: Auto-implant. Spleen. Regeneration. Howell-Jolly Body.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Evolução da massa corporal.....	19
Figura 2 -	Evolução do percentual de massa esplênica regenerada em relação à massa implantada.....	20
Figura 3 -	Fotomicrografias de autoimplantes esplênicos de ratos. Coloração de Hematoxilina e eosina.....	21
Figura 4 -	Fotomicrografias de autoimplantes esplênicos de ratos. Coloração: resorcina-fucsina de Weigert.....	22
Figura 5 -	Variação na imunomarcção para PCNA no tecido esplênico regenerado nas 16 semanas do experimento.....	23
Figura 6 -	Fotomicrografias de autoimplante esplênicos regenerados em ratos, imunomarcção para PCNA.....	23
Figura 7 -	Variação na imunomarcção para Caspase-3 no tecido esplênico regenerado nas 16 semanas do experimento.....	24
Figura 8 -	Fotomicrografias de autoimplante esplênicos regenerados em ratos. Imunomarcção para Caspase-3.....	25
Figura 9 -	Avaliação dos corpúsculos de Howell Jolly em esfregaço sanguíneo periférico dos animais esplenectomizados com autoimplante esplênico.....	26

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	10
1	OBJETIVO	15
2	MÉTODO	16
2.1	Contagem dos corpúsculos de Howell-Jolly	17
2.2	Microscopia de luz	17
2.3	Imunomarcção	18
2.4	Morfometria	18
2.5	Análise estatística	18
3	RESULTADOS	19
3.1	Massa corporal	19
3.2	Massa esplênica	19
3.3	Microscopia de luz	20
3.3.1	<u>Organização histológica</u>	20
3.3.2	<u>Exposição das fibras elásticas</u>	21
3.4	Imunomarcção	22
3.4.1	<u>Análise das células em proliferação</u>	22
3.4.2	<u>Análise das células em apoptose</u>	24
3.5	Regeneração funcional	25
4	DISCUSSÃO	27
5	CONCLUSÃO	32
	REFERÊNCIAS	34
	APÊNDICE - Splenic autotransplant regeneration in rats: morphofunctional and immunohistochemical evaluation.....	38
	ANEXO - Técnicas laboratoriais	61

INTRODUÇÃO

Durante mais da metade do século XX, a esplenectomia foi a principal indicação em caso de traumas esplênicos. Acreditava-se que a sua remoção cirúrgica, tanto devido a trauma abdominal quanto a tratamento eletivo de inúmeras enfermidades, não provocaria dano maior ao paciente^{1,2}. Contudo, já a partir de 1919, começou-se a perceber que a esplenectomia aumentava o risco ao desenvolvimento de infecções graves³, mas foi somente em 1952 que esse fato alcançou repercussão no meio científico, quando foi relatada a ocorrência de infecção fulminante após a realização de esplenectomia total em crianças com idade inferior a seis meses, portadoras de doenças hematológicas, comprovando a associação entre esplenectomia e sepse⁴. Em 1969, Diamond denominou esse quadro como infecção fulminante pós-esplenectomia⁵.

Inicialmente, entretanto, acreditava-se que esse tipo de infecção grave somente acontecia após esplenectomia em crianças, o que foi contestado por Singer, em 1973, que mostrou que ela poderia ocorrer também em adultos, após remoções esplênicas realizadas por qualquer indicação e em qualquer momento após o procedimento cirúrgico⁶. Com base na correlação entre sepse e esplenectomia, alternativas para preservar a função esplênica passaram a ser desenvolvidas, principalmente em pacientes com lesão esplênica por trauma⁶⁻⁸.

O implante autógeno heterotópico do baço parece ser a única alternativa para a preservação de tecido esplênico nos casos em que a realização da esplenectomia total é inevitável. Esta constatação foi observada por meio de achados clínicos e patológicos de implantes esplênicos espontâneos, denominados esplenose, observados após esplenectomias por trauma, mostrando a existência de regeneração morfológica e de muitas funções do baço⁹⁻¹².

Depois de implantado, o tecido esplênico passa por um processo de necrose quase completa e, posteriormente, inicia o seu processo de regeneração na camada periférica, a partir de três a quatro células que não se degeneram e se multiplicam em direção centrípeta, e, diferentemente do que ocorre com as células da parte central, gradualmente, substituem a zona necrótica. A regeneração parece ocorrer da seguinte forma: algumas horas após o implante, surge uma área de necrose, seguindo-se ativação e nova formação tecidual (dias após o implante) e formação de

polpas vermelha e branca (cerca de cinco semanas após o implante), levando à estrutura final (a partir de cerca de oito semanas após o implante)¹³.

Os vasos presentes no tecido autoimplantado originam-se da regeneração do implante e não de capilares oriundos do tecido circunvizinho. Somente após a desvascularização do implante, forma-se a zona necrótica central e surgem canais vasculares, construindo uma neovascularização que se anastomosa com capilares penetrantes do tecido ao redor¹⁴. No processo de revascularização, a formação vascular inicial surge cerca de 36 horas após o implante, tornando-se mais evidente entre 48 e 72 horas, sendo que, ao final do segundo dia, já existe a formação de vênulas¹⁵.

Muitas vezes, a zona periférica do implante é mais diferenciada que a parte central. Alguns autores mostraram que pequenos implantes regeneram-se em menos tempo do que grandes implantes^{16,17}. Com estes, a zona periférica pode desenvolver-se em tecido esplênico normal e o centro apresentar apenas uma camada de células conjuntivas proliferativas que penetram na zona necrótica, dificultando a sua regeneração morfológica e funcional^{16,17}.

Vários locais para o implante esplênico autógeno foram testados, como omento maior, tecido subcutâneo, bolsa mesentérica de intestino delgado, intramuscular e retroperitoneal, entre outros^{13,17,19}. Comparando estudos em ratos, na mesma idade e utilizando técnicas similares, implantes intraperitoneais parecem regenerar-se e funcionar melhor que os retroperitoneais e subcutâneos^{13,17}; implantes realizados na fáscia do músculo reto abdominal levam a regeneração da arquitetura esplênica, mas com presença de muitas áreas fibróticas¹⁸. Ademais, o implante de tecido esplênico tanto no omento quanto no tecido subcutâneo, em ratos, propicia regeneração morfológica idêntica ao tecido esplênico normal, mas funcionalmente diferentes^{13,19}.

Alguns estudos, tanto clínicos quanto experimentais, mostram a diversificação quanto ao número e tamanho dos tecidos autoimplantados. Millikan *et al.* (1982) implantaram cinco fragmentos esplênicos em bolsa omental, em pacientes submetidos a esplenectomia total por trauma abdominal. Dos 13 pacientes avaliados, em 12 foram obtidas imagens cintilográficas no local do implante e a contagem de plaquetas, assim como os níveis de IgM, encontravam-se dentro dos limites da normalidade¹¹. Patel *et al.* (1986) utilizaram fatias, fragmentos e pulverização de tecido esplênico em diversos locais na cavidade abdominal de ratos,

e verificaram que, após 16 semanas do procedimento, o implante de fatias no omento maior preservou a arquitetura esplênica e o que se correlacionou com maior índice de sobrevivência dos animais e de depuração de pneumococos inoculados por via intravenosa²⁰.

Outro fator de grande importância é a quantidade de massa esplênica necessária para gerar função esplênica, que é dependente da quantidade de tecido regenerado, mas não do número de fragmentos implantados²¹. Entretanto, existe um mínimo de massa crítica do tecido autoimplantado necessário para que se observe a regeneração da função esplênica e a maioria dos autores concorda que essa massa mínima deve ser superior a 25% da massa esplênica total do baço normal^{17,22-24}.

A investigação da função imunoprotetora dos autoimplantes esplênicos autógenos se dá, em sua maioria, pela exposição de animais a diversas bactérias, avaliando-se o nível de depuração desses microorganismos da corrente sanguínea²⁵⁻²⁸ e da mortalidade decorrente da sepse por eles provocada^{23,29}.

A verificação da viabilidade e funcionalidade de implantes esplênicos autógenos pode ser feita com a utilização de radiofármacos e também com a utilização de Doppler colorido, entre outros. Os radiofármacos servem como marcadores para a depuração sanguínea de material coloidal e de bactérias, testando dessa forma, a função fagocitária do sistema mononuclear fagocitário ou de hemácias marcadas, avaliando o seu seqüestro da circulação, mostrando que a capacidade de depuração de diferentes partículas depende de um baço funcional ou de tecido esplênico regenerado²⁹⁻³¹. O Doppler colorido pode ser utilizado para a diferenciação entre baços acessórios e de enxertos esplênicos, com base em sua forma e suprimento vascular³².

A proteção contra bacteremias se constitui em mais um método de verificação da viabilidade e funcionalidade de implantes esplênicos autógenos^{27,28,33}. Marques *et al* (2003) observaram que, após o implante de fragmentos no omento maior de ratos jovens e adultos, de ambos os sexos, ocorreu regeneração morfológica do tecido esplênico autoimplantado após 16 semanas e que esse implante preservou a função fagocitária do baço e propiciou a proteção contra a sepse por *Escherichia coli* inoculada por via intravenosa nesses animais²⁷.

Diversos estudos após esplenectomia total em humanos com a realização de autoimplante esplênico heterotópico mostraram o restabelecimento de muitas funções do baço. Das funções aparentemente preservadas, encontram-se a

capacidade de remover substâncias coloidais, eritrócitos alterados e inclusões corpusculares, como as de Howell-Jolly, Heinz e Pappenheimer, da corrente sanguínea^{9,10,21,34}.

O tecido esplênico normal está envolto por uma cápsula composta por tecido conjuntivo denso, por fibras elásticas e por poucas fibras musculares lisas, que lhe conferem a característica de esponjoso. Na cápsula, a camada mais externa é composta por células mesoteliais. Trabéculas irregulares de músculo liso e de tecido fibroelástico surgem da cápsula para dentro do parênquima esplênico, sendo que, no hilo esplênico, a cápsula torna-se mais espessada, pela presença de maior número de trabéculas³⁵.

As fibras do sistema elástico são conhecidas, há mais de um século, por sua coloração característica, que se deve à presença da elastina³⁶, sendo que a técnica de resorcina-fucsina de Weigert se constitui em um dos métodos mais utilizados para a pesquisa da existência dessas fibras dentro dos tecidos³⁷. Ultraestruturalmente, as fibras do sistema elástico apresentam-se compostas por um centro de elastina (material amorfo e homogêneo) circundado por microfibrilas (10-12 nm de diâmetro), constituído principalmente pela proteína fibrilina. No processo de desenvolvimento, as fibras do sistema elástico-microfibrilar se desenvolvem a partir destes feixes de fibrilina, com subsequente deposição de elastina, até que ocorra a sua maturação³⁸. Entretanto, em certos compartimentos teciduais, observam-se somente feixes de microfibrilas sem elastina (fibras oxitalânicas, descritas por Fullmer & Lillie, em 1958)³⁹, ou ainda feixes de microfibrilas com áreas esparsas de elastina (fibras elaunínicas, descritas por Gawlik, em 1965)⁴⁰. Assim, as diferentes fibras do sistema elástico possuem composição diversa de elastina, com as fibras oxitalânicas se constituindo naquelas que apresentam menor componente, e as elásticas, propriamente ditas, naquelas com maior concentração de elastina³⁶.

A utilização de técnicas de imuno-histoquímica com anticorpos monoclonais tem sido de grande valia para o reconhecimento de antígenos expressos por células em proliferação⁴¹. Para que ocorra a proliferação, as células têm que entrar em um processo complexo, o ciclo celular. O PCNA (antígeno de proliferação celular nuclear) é uma proteína não histônica de 36-kd, auxiliar da DNA polimerase, que se expressa em abundância em células em proliferação, estando presente somente nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular^{41,42}. A sua expressão inicia-se no final da fase G1, atinge o seu pico máximo na fase S, ocorrendo um declínio na fase G2 e M, haja

vista a sua longa meia vida⁴². Ele faz parte de uma família de proteínas chamada de “família de deslizamento da fita de DNA”, que tem como função proporcionar a ligação das polimerases replicantes à fita de DNA, o que é necessário para a duplicação do genoma. O PCNA também está relacionado a muitas proteínas envolvidas em diversos processos relativos ao DNA, tendo participação na sua replicação e reparo, no controle do ciclo celular, no metabolismo da cromatina, na expressão gênica e na apoptose⁴³.

No processo de apoptose, as caspases foram descritas como mediadores cruciais e, entre elas, a caspase-3 que se destaca como a executora final essencial para as alterações nucleares associadas a apoptose. Estudos recentes indicam que a ativação das caspases é o indicador mais específico do mecanismo de morte celular programada e que, ainda mais, a identificação da caspase-3 como agente efetor final torna a sua detecção um indicador único e extremamente sensível de apoptose^{44,45}.

O baço é um órgão de grande relevância na defesa do organismo e é comumente afetado em casos de trauma abdominal. Logo, deve-se tentar a preservação de sua função após a realização de esplenectomias totais, e a única alternativa parece ser a realização do autoimplante esplênico.

A elastogênese tem sido alvo de muitos estudos relacionados com o desenvolvimento orgânico ontogenético, devido à capacidade das fibras que compõem o sistema elástico-microfibrilar de sustentar tecidos e órgãos, e, ao mesmo tempo, haja vista as suas propriedades elásticas, permitirem a sua movimentação e crescimento^{46,47}.

Contudo, a literatura médica existente ainda carece de uma descrição pormenorizada do processo da regeneração esplênica, tanto morfológica quanto funcional, assim como de dados acerca da produção de sua matriz extracelular fibrosa.

Desse modo, torna-se relevante a análise qualitativa e quantitativa do desenvolvimento morfológico do processo de regeneração, assim como da depuração de corpúsculos de Howell-Jolly da corrente sanguínea, em ratos submetidos a esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico.

1 OBJETIVO

Analisar o desenvolvimento da regeneração morfológica e funcional do tecido esplênico autoimplantado em ratos submetidos a esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico, utilizando técnicas histológicas e imuno-histoquímicas quantitativas e qualitativas, sob microscopia de luz, e mediante a verificação da depuração sanguínea de corpúsculos de Howell-Jolly.

2 MÉTODO

O protocolo de manuseio e experimentação dos animais foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (n.º do protocolo: CEA/233/2008). Todos os procedimentos seguiram, rigorosamente, a regulamentação existente sobre experimentação com animais⁴⁸.

Foram utilizados 112 ratos *Wistar* albinos machos adultos, entre dois e três meses de idade com massa corporal média de 221 g \pm 3 oriundos do Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos em biotério climatizado, com fotoperíodo diário de 12 horas (claro-escuro), em gaiolas apropriadas e, no decorrer do experimento, receberam ração apropriada para ratos e água *ad libitum*.

Os animais foram submetidos à esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico e distribuídos aleatoriamente em 16 grupos, cada um contendo sete animais, no qual cada grupo representa um período (semana) para avaliação após o autoimplante esplênico. Assim, os 16 grupos representam as 16 semanas do experimento.

Após jejum de seis horas, os animais de todos os grupos experimentais foram submetidos ao procedimento cirúrgico sob anestesia geral, com associação de cloridrato de quetamina (35 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg), por via intraperitoneal. Depois de anestesiados, foram submetidos à tricotomia abdominal, seguida de antisepsia com iodopovidine e aposição de campos operatórios.

O baço foi abordado através de incisão abdominal na linha média supraumbilical, com cerca de 3 cm de extensão. Após a sua retirada, ele foi pesado e seccionado transversalmente, em cinco fragmentos, cada um com cerca de 2 mm de espessura. Os fragmentos esplênicos, correspondentes à massa total do órgão, foram implantados no omento maior, com sutura contínua, utilizando fio de ácido poliglicólico 4-0 (Dexon[®]). Os pontos foram dados alternadamente, no omento e no tecido esplênico, para que houvesse interposição de tecido omental entre os fragmentos esplênicos. A laparorráfia foi realizada com sutura contínua, em dois planos (peritônioaponeurótico e pele), com fio de ácido poliglicólico 3-0 (Dexon[®]).

Semanalmente, os animais dos grupos correspondentes foram anestesiados com cloridrato de quetamina (35 mg/kg) e xilazina (5 mg/kg), por via intraperitoneal,

sendo submetidos a coleta de amostra sanguínea para realização de esfregaço, visando à pesquisa da presença de corpúsculos Howell-Jolly. Após a coleta sanguínea, os animais foram mortos, por sobredose anestésica com pentobarbital por via intraperitoneal, e submetidos à laparotomia exploradora para retirada dos autoimplantes esplênicos regenerados, para posterior análise sob microscopia de luz e imunohistoquímica.

2.1 Contagem dos Corpúsculos de Howell-Jolly

Em cada uma das lâminas coradas com May-Grunwald-Giemsa (MGG), foi realizada a contagem dos corpúsculos de Howell-Jolly em dez campos microscópicos, cada um com 100 hemácias, perfazendo 1.000 hemácias para cada lâmina. Dessa forma, o número total de corpúsculos observados em todos os campos microscópicos nos fornecerá um percentual de presença desses corpúsculos (p.ex. se foi observada a presença de apenas um corpúsculo em 1.000 hemácias analisadas, isso equivale a 0,1%).

2.2 Microscopia de luz

Os fragmentos do baço foram fixados em solução de formaldeído a 4% em tampão fosfato a 0,1M, pH de 7,2, por 48 horas em temperatura ambiente e processadas e incluídas em Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) de acordo com a rotina histológica para microscopia de luz, sendo posteriormente seccionados com 5 µm de espessura (micrótomo American Optical, Spencer®). As secções foram coradas pelos seguintes métodos: hematoxilina e eosina (HE), para observação geral do tecido; e resorcina-fucsina de Weigert para observação de fibras do sistema elástico. Após processamento e coloração histológica, as lâminas foram observadas ao microscópio óptico (microscópio Olympus BX51) e as imagens digitais adquiridas (câmera LC Evolution, formato TIFF, colorido de 36-bits, 1280x1024 pixels).

2.3 Imunomarcção

A técnica da imunoperoxidase foi empregada com o uso de anticorpos específicos para imunomarcção de: PCNA, para observação das células em proliferação; caspase-3, para observação de células em apoptose.

2.4 Morfometria

As análises das imunomarcções para PCNA e caspase-3 foram realizadas com o auxílio do programa Image-Pro Plus, versão 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). As imagens foram adquiridas (formato TIFF, 36-bit color, 1.280 x 1.024 pixels) com câmera LC Evolution acoplada a microscópio Olympus BX51. Cinco imagens digitais aleatórias dos cortes não consecutivos do tecido esplênico regenerado por animal foram adquiridas.

A quantificação da densidade de volume de imunomarcção (Vv [imunomarcção]) foi realizada por análise de imagens. Utilizando ferramentas do software Image-Pro Plus, a imunomarcção na imagem digital foi selecionada e preenchida por uma cor. Após isto, a imagem foi segmentada (transformação em imagem preta e branca pura, onde o branco foi atribuído às regiões imunomarcadas e o preto atribuído ao tecido remanescente) e a fração de área relativa de cor "branca" foi determinada automaticamente com a ferramenta histograma⁴⁹.

2.5 Análise estatística

Os dados são apresentados como média \pm EPM. As diferenças entre os grupos foram testadas pela análise de variância *one-way* (ANOVA), com pós-teste de Tukey. As análises e gráficos foram realizados com o programa *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows (GraphPad Software, São Diego, Califórnia, EUA).

Em todos os casos, o valor de $p < 0,05$ foi considerado para a rejeição da hipótese nula de similaridade entre os grupos.

3 RESULTADOS

3.1 Massa corporal

A massa corporal dos animais na primeira semana do experimento apresentou uma média de peso de 221 ± 3 g. Ao final do experimento, na décima sexta semana, a massa corporal dos animais aumentou significativamente ($p < 0,0001$) para 324 ± 49 g, de acordo com a evolução da idade (Fig. 1).

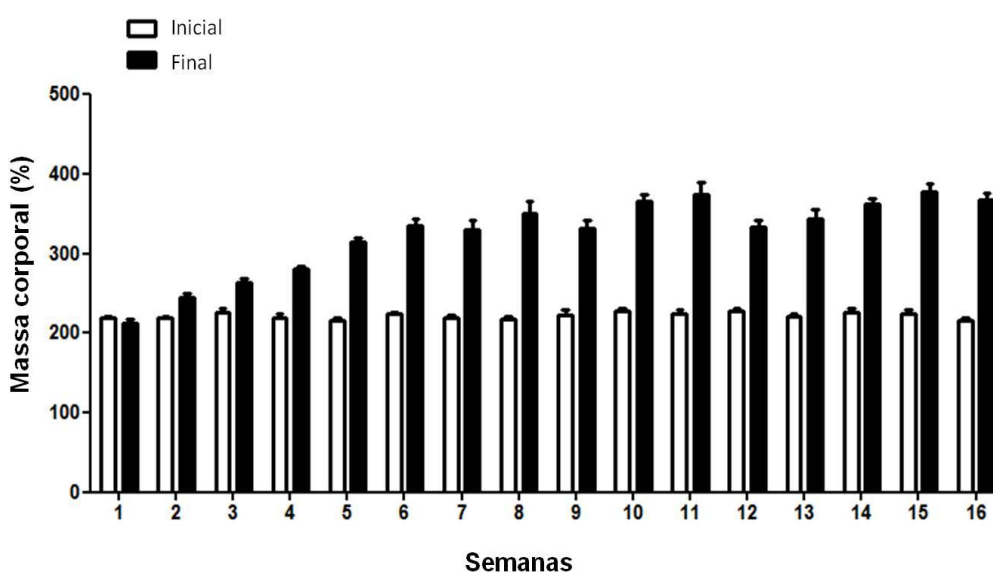


Figura 1 – Evolução da massa corporal.

Massa corporal na semana inicial do experimento (barra clara), e massa corporal na semana final do experimento (barra escura). Ao final do experimento, a massa corporal dos animais aumentou significativamente ($p < 0,001$) em comparação à fase inicial do experimento.

3.2 Massa esplênica

Na primeira semana após o implante, a massa do tecido esplênico regenerado se apresentou significativamente reduzida para 10% do tecido esplênico originalmente implantado. Na terceira, quinta, oitava, décima segunda e décima sexta semanas, o tecido esplênico regenerado aumentou gradativamente para 13%, 15%, 20%, 21% e 28%, respectivamente, se comparado com a primeira semana após implante do tecido esplênico (Fig. 2).

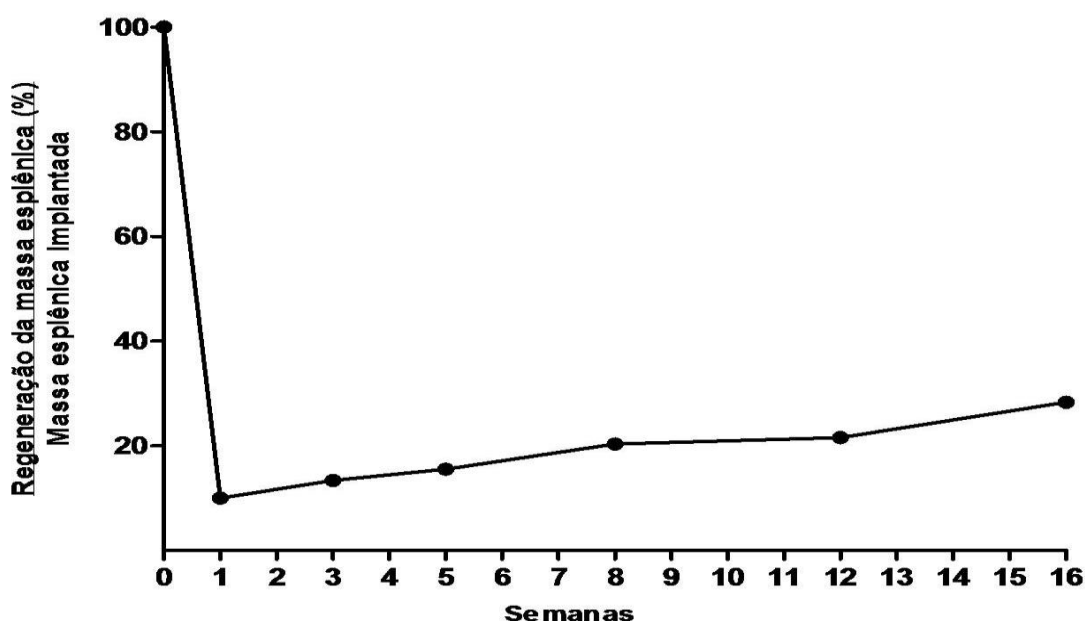


Figura 2. Evolução do percentual de massa esplênica regenerada em relação à massa implantada.

Na primeira, terceira, quinta, oitava, décima segunda e décima sexta semanas foi encontrado 10%, 13%, 15%, 20%, 21% e 28% da massa esplênica regenerada, respectivamente.

3.3 Microscopia de luz

3.3.1 Organização histológica

Na 1ª semana, foi encontrado um agregado linfocitário de aspecto folicular (Figura 3A). Na 3ª semana, notaram-se concentrações focais de linfócitos, constituindo o início da formação de folículos linfóides, entre os quais se constitui a polpa vermelha, com hemácias e sinusóides (Figura 3B). Na 5ª semana (Figura 3C), observou-se presença de folículos linfóides, sem arteríola central e sinusóides esplênicos repletos de hemácias. Na 8ª semana (Figura 3D), os folículos se apresentaram mais desenvolvidos, ou seja, com presença de arteríola central e a polpa vermelha também com sinusóides repletos de hemácias. Na 12ª semana (Figura - 3E), observou-se aumento no número de folículos linfóides, porém o tamanho dos folículos é menor, em comparação as semanas anteriores. Na 16ª semana (Figura 3F), os folículos se apresentam ainda em maior número e mais bem desenvolvidos, como um neobaço formado, com características histológicas mantidas.

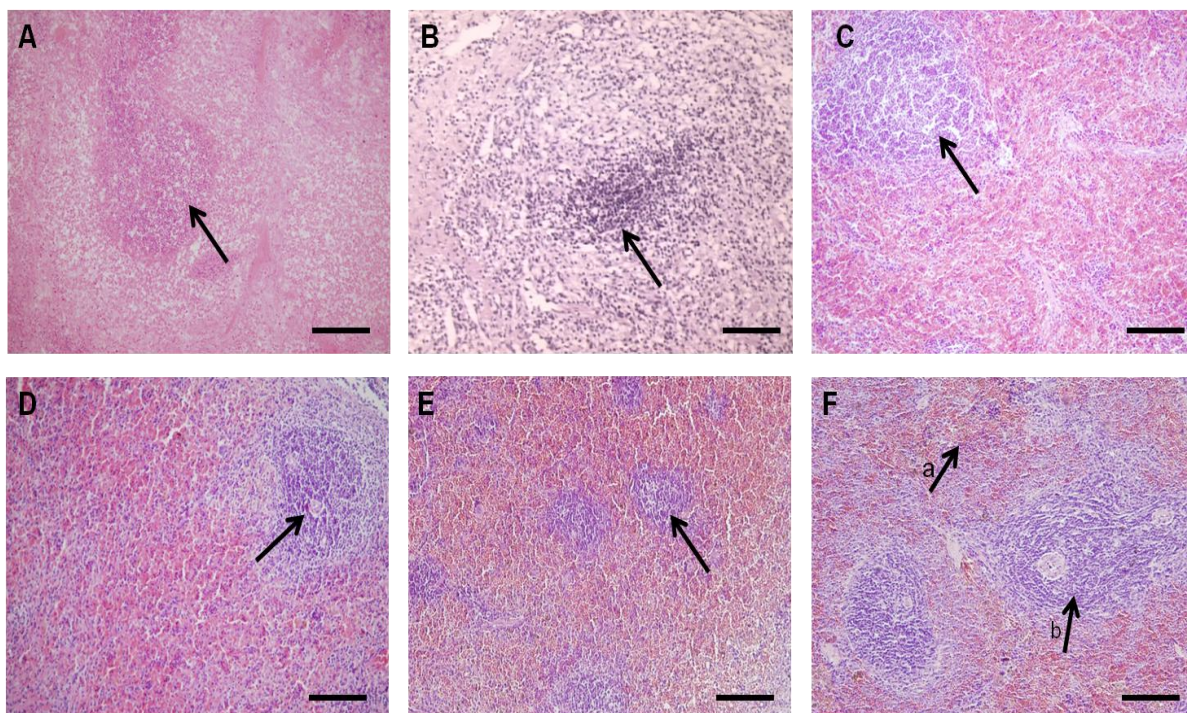


Figura 3 - Fotomicrografias de autoimplantes esplênicos de ratos. A – 1.^a semana, agregado linfocitário de aspecto foliolar, (seta); B – 3.^a semana, infiltrado linfocitário, (seta); C – 5.^a semana, folículo linfóide sem arteríola central, (seta); D – 8.^a semana, folículo linfóide com arteríola central, (seta); E – 12.^a semana, número maior de folículos linfóides, porém menores, (seta) e F – 16.^a semana, polpa vermelha e polpa branca (seta a e seta b, respectivamente). Coloração: hematoxilina-eosina. Barra: 50 µm.

3.3.2 Exposição das fibras elásticas

Na 1^a semana, identificou-se a presença de cápsula e trabéculas ricas em fibras do sistema elástico, projetadas para a região central do órgão (Figura 4A). Já na 3^a semana, observou-se elastogênese do parênquima no tecido autoimplantado de forma difusa (Figura 4B). Na 5^a semana, essas fibras do sistema elástico estão presentes na cápsula e trabéculas, que se encontram menos desenvolvidas (Figura 4C). Na 8^a semana, as fibras se apresentam distribuídas em todo o parênquima (Figura 4D). Na 12^a semana, a região capsular apresenta maior quantidade de fibras do sistema elástico (Figura 4E). Na 16^a semana, existe tecido de sustentação fibroelástico em todo o parênquima do novo tecido esplênico.

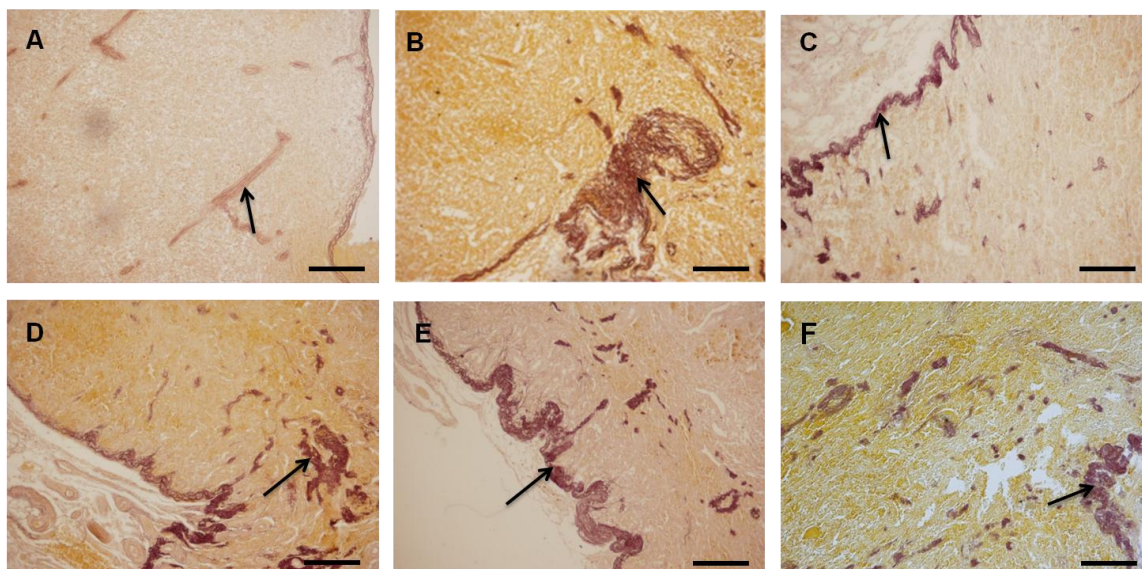


Figura 4 - Fotomicrografias de autoimplantes esplênicos de ratos. As setas indicam os feixes de fibras do sistema elástico-microfibrilar. A – 1.^a semana; B – 3.^a semana; C – 5.^a semana; D – 8.^a semana; E – 12.^a semana e F – 16.^a semana. Coloração: resorcina-fucsina de Weigert. Barra: 50 μ m.

3.4 Imunomarcção

3.4.1 Análise da proliferação celular

Imunorreações positivas para PCNA foram encontradas nos tecidos autoimplantados dos animais em todas as semanas do experimento, com exceção da primeira semana após o autoimplante. No que concerne à imunomarcção do autoimplante esplênico, evidenciou-se uma expressão gradativa das células a partir da 2.^a semana, sendo que nas 9.^a e 10.^a semanas, observou-se aumento significativo na imunodensidade para PCNA (67% e 68% respectivamente, $p < 0,0001$) quando comparado às demais (Fig. 5 e Fig. 6).

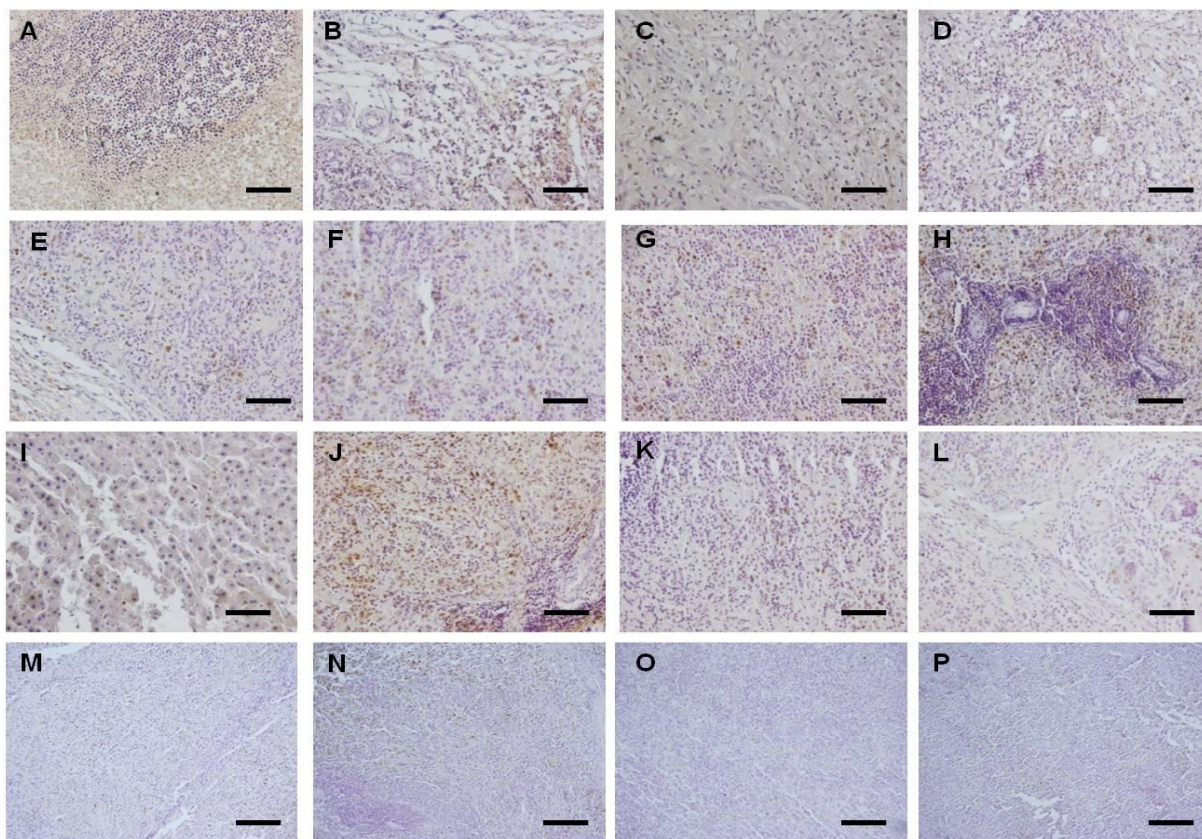


Figura 5 - Fotomicrografias de autoimplante esplênicos regenerados em ratos. 1.^a semana (A), 2.^a semana (B), 3.^a semana (C), 4.^a semana (D), 5.^a semana (E), 6.^a semana (F), 7.^a semana (G), 8.^a semana (H), 9.^a semana (I), 10.^a semana (J), 11.^a semana (K), 12.^a semana (L), 13.^a semana (M), 14.^a semana (N), 15.^a semana (O), e 16.^a semana (P). Imunomarcção para PCNA. Barra: 50 μ m.

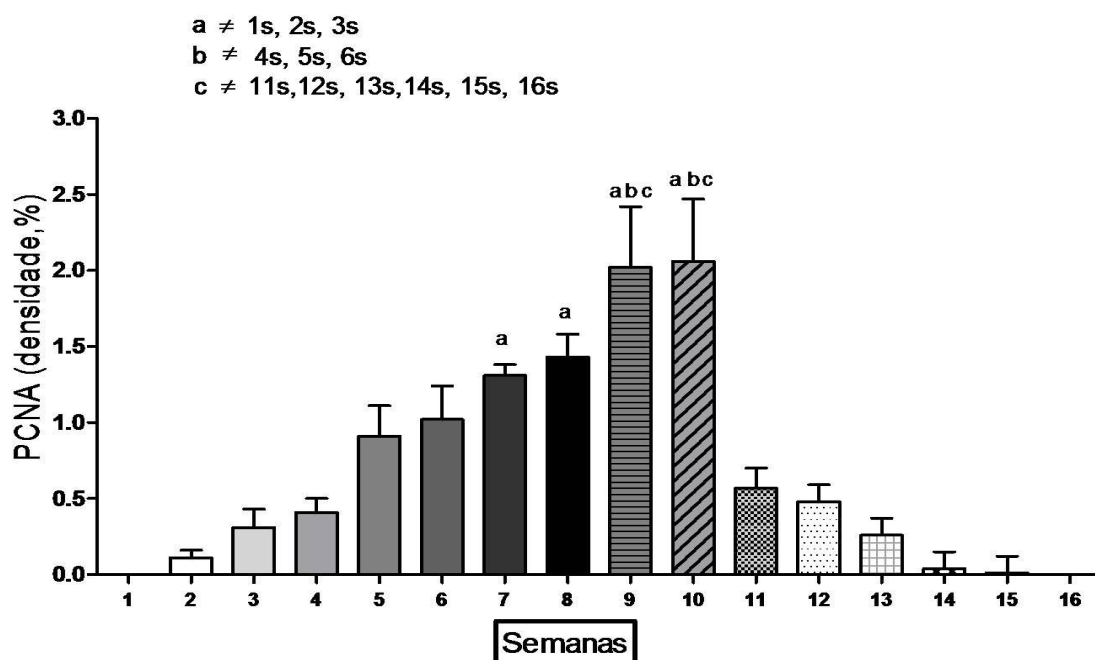


Figura 6. Variação na imunomarcção para PCNA no tecido esplênico regenerado nas 16 semanas do experimento.

Legenda: [a] ≠ 1.^a, 2.^a e 3.^a semanas; [b] ≠ 4.^a semana, 5.^a semana, 6.^a semana; [c] ≠ 11.^a semana, 12.^a semana, 13.^a semana, 14.^a semana, 15.^a semana, 16.^a semana ($p < 0,05$).

3.4.2 Análise das células em apoptose

No que tange à marcação para caspase-3, na primeira semana observou-se o um número significativamente maior de células marcadas se comparado com qualquer uma das outras semanas estudadas ($p < 0,01$). Já na segunda semana, houve um decréscimo significativo da imunomarcção para 27%; na terceira semana, este número diminuiu para 42%, e, da quarta semana em diante, a imunomarcção reduziu-se progressivamente, atingindo 93% e 94% na nona e décima semanas, respectivamente, quando comparadas a primeira semana (Fig. 7 e Fig. 8).

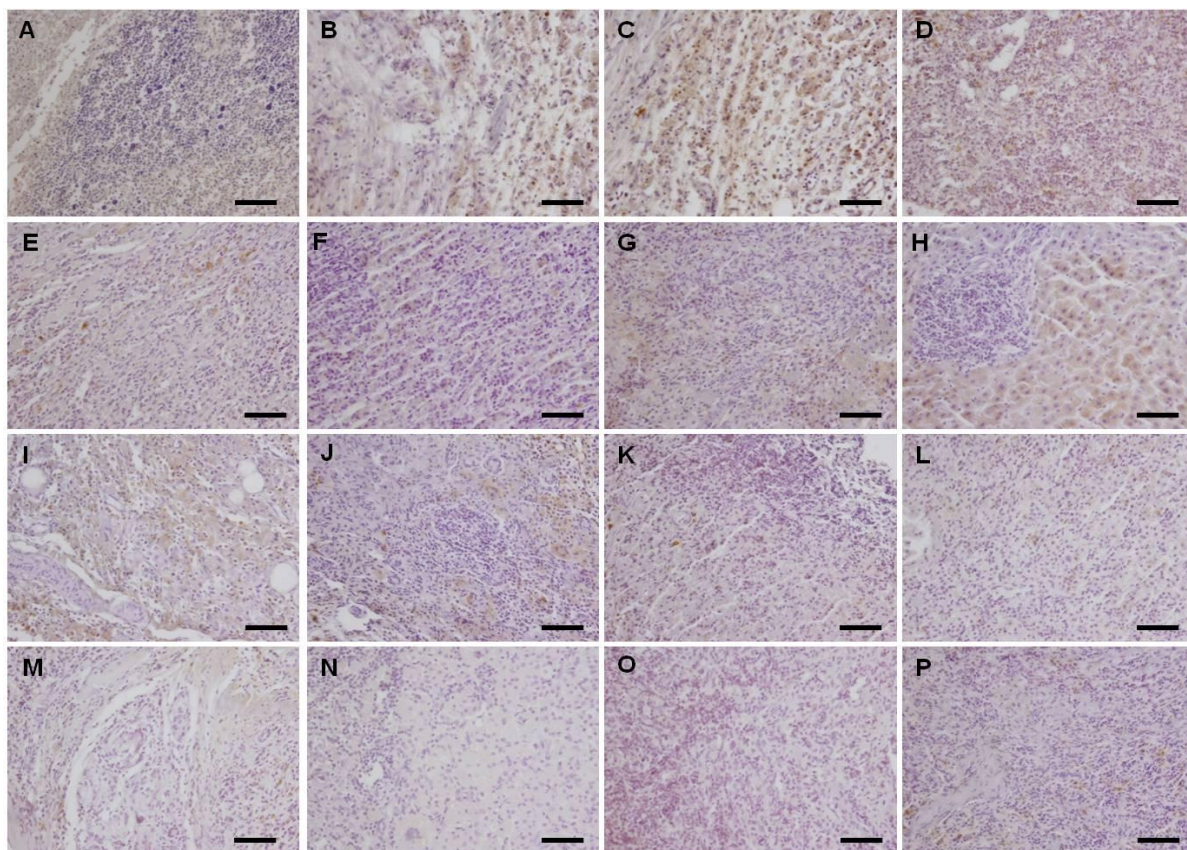


Figura 7 - Fotomicrografias de autoimplante esplênicos regenerados em ratos. 1.^a semana (A), 2.^a semana (B), 3.^a semana (C), 4.^a semana (D), 5.^a semana (E), 6.^a semana (F), 7.^a semana (G), 8.^a semana (H), 9.^a semana (I), 10.^a semana (J), 11.^a semana (K), 12.^a semana (L), 13.^a semana (M), 14.^a semana (N), 15.^a semana (O) e 16.^a semana (P). Imunomarcção para Caspase-3. Barra: 50 μ m.

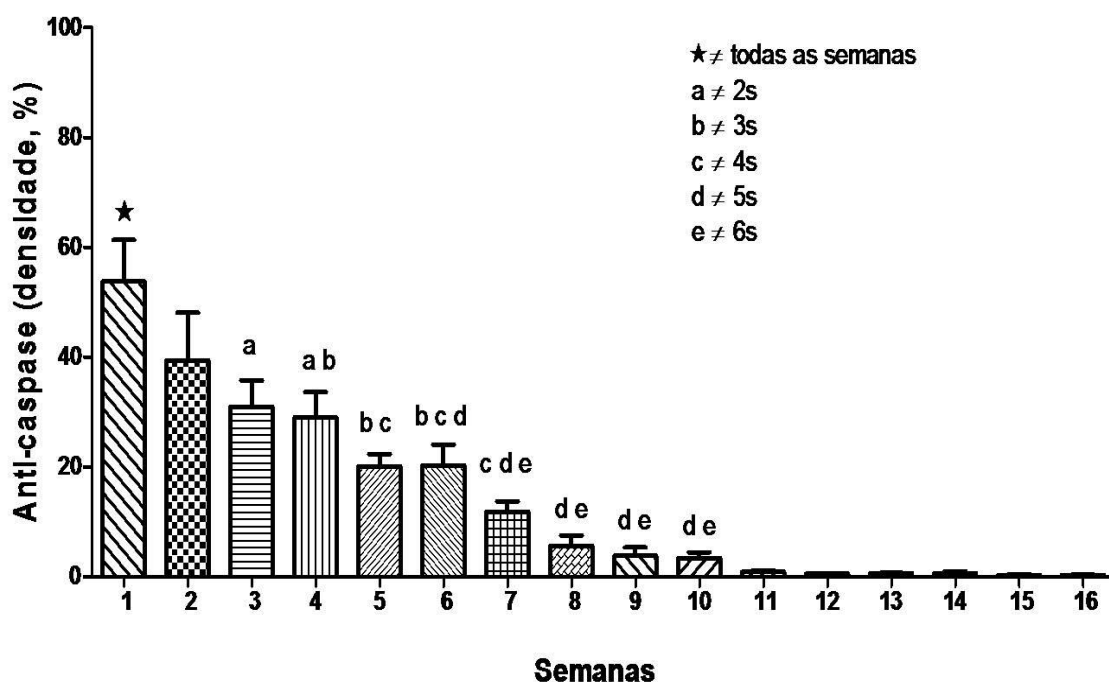


Figura 8. Variação na imunomarcção para Caspase-3 no tecido esplênico regenerado nas 16 semanas do experimento.

Legenda: ★ ≠ todas as semanas; [a] ≠ 2.^a semana; [b] ≠ 3.^a semana; [c] ≠ 4.^a semana; [d] ≠ 5.^a semana; [e] ≠ 6.^a semana ($p < 0,05$).

3.5 Regeneração funcional

No sangue periférico dos animais esplenectomizados, foi verificada a presença de cerca de 3% de corpúsculos de Howell-Jolly até a quarta semana, a partir dessa semana houve um decréscimo para 2%. Na oitava semana, havia 1% de corpúsculos, situação mantida até a décima segunda semana. No entanto, somente na décima sexta semana, não foi mais identificada a presença desses corpúsculos (Fig. 9).

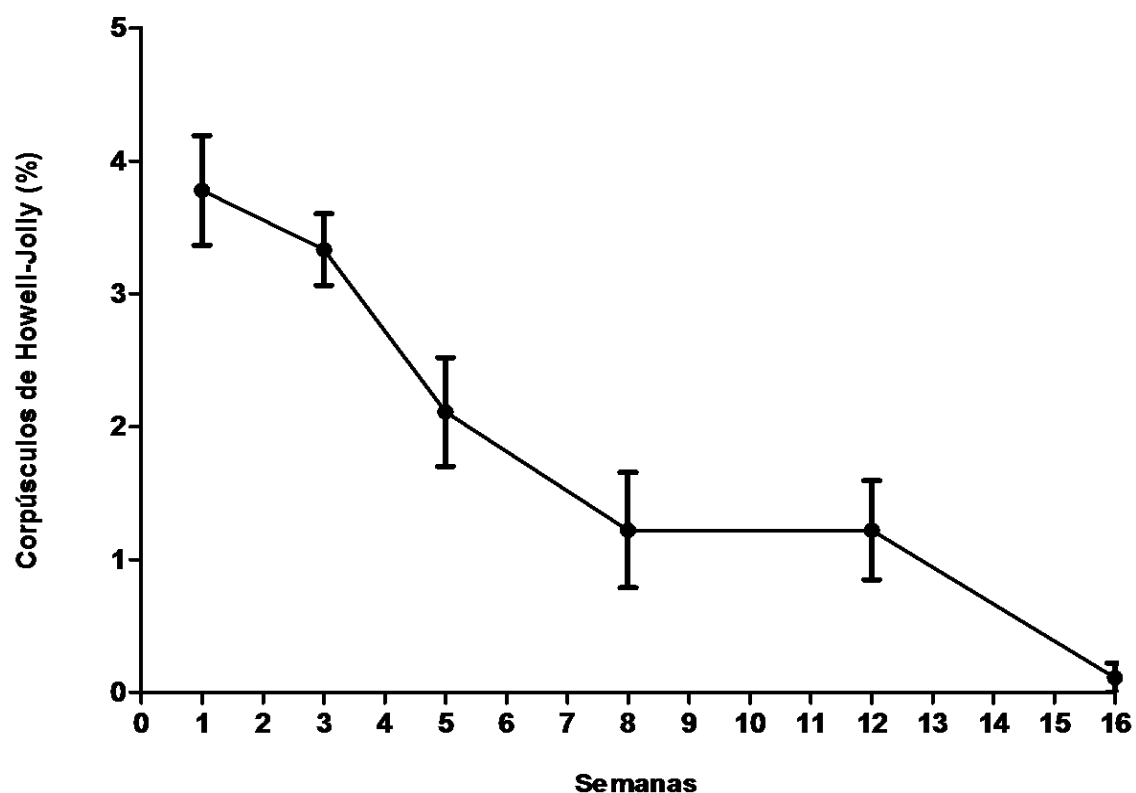


Figura 9. Avaliação dos corpúsculos de Howell-Jolly em esfregaço sanguíneo periférico dos animais esplenectomizados com autoimplante esplênico. Nas primeiras quatro semanas, observou-se cerca de 3% de corpúsculos, havendo diminuição para 2% na quinta semana; já na oitava semana, ocorreu diminuição para 1%, que se manteve até a décima segunda semana; na décima sexta semana, não se observou mais a presença de corpúsculos de Howell-Jolly.

4 DISCUSSÃO

Considerando que o baço é um importante órgão de defesa do organismo, muitos estudos clínicos e experimentais vêm sendo realizados visando à sua preservação. Dentre outros, são preconizados o uso de substâncias hemostáticas e de tamponamentos, esplenectomias parciais e subtotais e suturas^{50,51}. Quando nenhuma dessas formas de preservação é possível e a esplenectomia total é inevitável, a única alternativa parece ser a realização do autoimplante esplênico⁵¹⁻⁵³.

Estudos têm demonstrado que, em local adequado, após um período de necrose, o implante esplênico autógeno é capaz de regenerar-se, readquirindo características microscópicas de um baço normal, contendo polpa branca e vermelha, e possibilitando a recuperação de algumas das suas funções^{16,20,52}.

Apesar do intervalo de tempo para regeneração do autoimplante esplênico ser objetivo de pesquisa de muitos autores, ainda não existe consenso em relação a esse parâmetro, com relatos de diversos autores variando entre cinco e dezesseis semanas^{8,27,53}.

Observou-se regeneração morfológica do autoimplante a partir da oitava semana, com polpa vermelha e polpa branca constituída por centro germinativo e arteríola central, ratificando os achados de Van Wyck *et al.* (1980)²⁴. Em contraposição, Tavassoli *et al.* (1973)¹⁶ e Linuma *et al.* (1992)¹⁷ mostraram regeneração morfológica completa após cinco e 16 semanas da realização do autoimplante.

Na 1.^a semana do experimento, havia um agregado linfocitário de aspecto folicular, com intensa marcação pela caspase-3, mostrando células em processo de apoptose^{44,45}. Como não houve marcação para PCNA, um marcador de proliferação celular⁴³, também não se observou sinais de elastogênese, apenas poucas fibras na cápsula e nas trabéculas, o que nos leva a acreditar que tanto os linfócitos presentes como as fibras podem se constituir em resquício do autoimplante, demonstrando, de fato, que ainda não se iniciou o remodelamento do tecido esplênico autoimplantado.

Na 3.^a semana, as concentrações focais de linfócitos exibem ainda uma significativa marcação pela caspase-3, indicando apoptose de suas células, com pequena imunomarcação de PCNA e, portanto, um remodelamento esplênico ainda discreto, tanto da polpa branca quanto da polpa vermelha, o que é reforçado pela pouca coloração de tecido fibroso elástico-microfibrilar.

Na 5.^a semana, observou-se presença de folículos linfóides individualizados, sem arteríola central e diferenciados da polpa vermelha circunjacente, que já se apresentava repleta de hemácias nos sinusóides esplênicos. Com a imunomarcção para caspase-3, demonstrou-se que houve diminuição significativa de células em apoptose quando comparado às primeiras quatro semanas, reduzindo o processo de degeneração apoptótica enquanto aumentava significativamente a imunomarcção para evidencição de PCNA. Estes resultados mostram que o remodelamento esplênico em nível celular, tanto linfocitário quanto dos componentes da polpa vermelha, se encontra em franco progresso, condizente com o aumento de massa tecidual do parênquima autoimplantado. Nesse mesmo período, observa-se também o aumento da elastogênese.

Na 8.^a semana, chama atenção no desenvolvimento do parênquima o aumento da imunomarcção para PCNA nos folículos, significativamente diferente do observado em semanas anteriores, e, ainda, a diferenciação da arteríola folicular, assumindo o folículo, então, nesta semana, as características da polpa branca esplênica estão completas. Da mesma maneira e reforçando o remodelamento benéfico do baço, ocorre diminuição significativa da imunomarcção para caspase-3. A polpa vermelha também exibe diferenciação, com sinusóides repletos de hemácias, e a elastogênese continua a se manifestar, com o crescimento das trabéculas.

Na 12.^a semana, observou-se aumento aparente no número de folículos linfóides. Contudo, o tamanho dos folículos parece diminuído em comparação às semanas anteriores. Essa redução aparente da polpa branca também vem sendo observada por muitos autores^{18,52,55}. A imunomarcção para PCNA sofre grande e significativa diminuição em relação às 9.^a e 10.^a semanas, que se caracterizam como aquelas em que ocorre um pico na proliferação celular do parênquima do neobaço. A imunomarcção para caspase-3 praticamente desaparece, assim se mantendo até o final do período de observação. O processo de elastogênese também se estabiliza, não se observando aumento das trabéculas. Estas características imunohistoquímicas levam à observação de que se mantêm as modificações relacionadas com o remodelamento morfológico do neobaço.

Na 16.^a semana, não se observa a imunomarcção para PCNA e os folículos se apresentam com características semelhantes ao baço normal, com características histológicas mantidas, praticamente sem alterações em relação àquelas observadas

desde a 12.^a semana.

Neste trabalho, optou-se pela realização do autoimplante no omento maior, levando em consideração diversos estudos na literatura que mostram ser este local o mais adequado para o processo de regeneração^{23,27,28}, pois permite melhores resultados, possivelmente devido à drenagem venosa para a veia porta, que parece se constituir em fator determinante para a recuperação da função esplênica^{13,16,18,20}.

Marques *et al.* (2003 e 2004), com o implante de segmentos esplênicos de cerca de 2 mm no omento maior, em ratos, observaram, após 16 semanas, a regeneração de um tecido com a arquitetura macro e microscópica de um baço normal, de dimensão menor, e que preservou a função fagocitária contra bactérias^{27,28}. Em concordância, Malagó *et al.* (2008) avaliaram macro e microscopicamente a evolução tardia do autoimplante esplênico de fragmentos de baço no omento maior, mesentério e cavidade peritoneal, após 24 semanas de observação, concluíram que o omento maior é o melhor local para a fixação do autoimplante esplênico, preservando a função do baço na defesa do organismo. Esses autores analisaram macro e microscopicamente a evolução do implante, sendo que no estudo histológico foram adotados critérios qualitativos e quantitativos; já para avaliação funcional, foi realizada a contagem de linfócitos e de macrófagos ativos fagocitando hemossiderina, plasmócitos, fibroblastos, fibrócitos, células gigantes, monócitos, espaços intersticiais e fibras de colágenos⁵⁶.

Utilizou-se implante da massa esplênica no omento maior, dividida em cinco segmentos de cerca de 2 mm. Torres *et al.* (1994) observaram que a utilização de fragmentos pequenos, com espessura entre 3 e 5 mm, como os que utilizamos, permitem manter maior contato com os vasos omentais e preservam a estrutura sinusoidal do baço em ratos⁵⁷. Corroborando esse achado, Pabst (1999) verificou que quanto mais finos e pequenos os fragmentos empregados, menor a necrose subsequente, por encurtar a distância para a difusão do oxigênio e para nutrientes, levando a uma regeneração mais precoce⁵⁸. Além disso, com fragmentos mais espessos, a necrose é mais intensa e a área central do tecido fica totalmente comprometida antes que o processo regenerativo possa alcançá-la, demonstrando ser a espessura do fragmento de tecido esplênico empregado para o autoimplante um fator de grande relevância na preservação da viabilidade tecidual¹⁷.

Malagó *et al.* (2008), utilizando segmentos esplênicos de 15 mm no omento maior, observaram que os fragmentos autoimplantados adquiriram características

similares às de um baço normal após 24 semanas, com aumento no número de macrófagos e melhora na fagocitose de hemossiderina e de plasmócitos, levando à conclusão de recuperação funcional na defesa do organismo⁵⁶.

A massa esplênica autoimplantada mínima deve ser de, ao menos, 25%⁸⁻¹⁰, não parecendo existir qualquer relação com a quantidade de fragmentos implantados⁵³. Apesar disto, neste estudo optou-se por implantar toda a massa do baço, como vem sendo utilizado, desde 2001, em uma linha de pesquisa em desenvolvimento no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Fundamentados na observação de que a massa regenerada depende da massa mínima implantada^{22,33}, observou-se regeneração de 28% da massa esplênica autoimplantada na décima sexta semana. Esses resultados são semelhantes aos encontrados por Marques *et al.* (2004) que, também ao implantarem a totalidade da massa do baço, no mesmo local e após o mesmo período, observaram diferença na massa esplênica regenerada em animais jovens e adultos, de 33% e 25%, respectivamente; esses autores também constataram que, no tocante ao sexo dos animais, fêmeas apresentaram maior percentual de massa regenerada (46%) que machos (23%)²⁸. Entretanto, esses resultados diferem dos obtidos por Inuma *et al.* (1992) que, após utilizarem 50% da massa do baço autoimplantada no omento maior, verificaram o percentual de massa esplênica regenerada, com duas, dezesseis, vinte e quarenta e oito semanas, encontrando 35%, 67%, 75% e 80%, respectivamente¹⁷.

A função de depurar inclusões corpusculares tem sido demonstrada por meio da pesquisa de presença de corpúsculos de Howell-Jolly no interior das hemácias^{15,18,19}. Neste estudo, foram obtidos dados relevantes relacionados à regeneração funcional do autoimplante esplênico com a verificação da presença desses corpúsculos no sangue periférico dos animais esplenectomizados.

Existe grande diversidade de resultados em alguns estudos que avaliaram a presença desses corpúsculos na corrente sanguínea, após a realização de autoimplante esplênico, sendo relatado o desaparecimento desses corpúsculos a partir de quatro semanas²⁰ até três e seis meses⁵⁹. Inuma *et al.* (1992), também trabalhando com ratos submetidos a esplenectomia total combinada com autoimplante esplênico, realizaram acompanhamento desses animais durante 48 semanas e observaram que os corpúsculos desapareceram a partir de 16 semanas

do implante, concluindo que a regeneração funcional se dê a esse tempo¹⁷.

A observação do aumento da atividade funcional do tecido autoimplantado, demonstrado pela redução na contagem de corpúsculos de Howell-Jolly a partir da 8.^a semana, mantendo-se até a 12.^a semana, coincide com o pico de expressão de PCNA nas 9.^a e 10.^a semanas. É possível que o aumento do número de células no parênquima se traduza em maior capacidade funcional de depuração do órgão, o que também se relaciona com o restabelecimento das características morfológicas do tecido autoimplantado encontradas a partir da 8.^a semana de observação.

A literatura médica carece de informações acerca de uma descrição pormenorizada dos eventos celulares e da matriz extracelular relativas ao processo de regeneração esplênica após a realização do autoimplante esplênico, apesar de inúmeros autores tratarem desse tema em suas linhas de pesquisa^{50,51}. Desta forma, entendemos que os dados aqui apresentados se constituem em relevante contribuição para o conhecimento dos processos celulares e teciduais do remodelamento do autoimplante do baço.

Ainda que este trabalho leve a avanços no entendimento do processo de regeneração do autoimplante esplênico, estudos adicionais são necessários para melhor entendimento desse processo, com a utilização de outras técnicas histoquímicas e imuno-histoquímicas, e com o emprego de diferentes espécies animais e em diversas faixas etárias.

5 CONCLUSÃO

O autoimplante esplênico no omento maior de ratos, a partir de oito semanas, adquire características morfológicas de um baço normal, mesmo momento em que parece iniciar-se a sua regeneração funcional.

REFERÊNCIAS

1. Rodrigues AZ, Nigro AJT, Paiva ER, Sementilli A, Tavares NM. Estudo comparativo da viabilidade de fragmento de tecido esplênico implantado no omento maior ou na tela subcutânea em ratas. *Acta Cir Bras.* 1991; 6(2):64-7.
2. Schwartz PE, Sterioff S, Much P, Melton III LJ, Offord KP. Postsplenectomy sepsis and mortality in adults. *JAMA* 1982; 248:2279-83.
3. Morris DH, Bullock FD. The importance of the spleen in resistance to infection. *Ann Surg* 1919; 70(5):513-21.
4. King H, Shumacker HB Jr. Splenic studies I. Susceptibility to infection after splenectomy performed in infancy. *Ann Surg* 1952; 136:239-42.
5. Diamond LK. Splenectomy in childhood and the hazard of overwhelming infection. *Pediatrics* 1969; 43(5):886-9.
6. Singer D. Postsplenectomy sepsis. *Perspect Pediatr Pathol* 1973; 1:285-311.
7. Marques RG, Petroianu A. Overwhelming postsplenectomy infection. *Arg Gastroenterol* 2003; 40(1):47-54.
8. Cadili A, de Gara C. Complications of splenectomy. *Am J Med* 2008; 121(5):371-5.
9. Patel JM, Williams JS, Shmigel B, Hinshaw JR. Preservation of splenic function by autotransplantation of traumatized spleen in man. *Surgery* 1981; 90: 683-8.
10. Resende V, Petroianu A. Estudo funcional tardio do auto-implante esplênico após trauma complexo do baço humano. *Rev Col Bras Cir* 2001; 28:165-70.
11. Millikan JS, Moore EE, Moore GE, Stevens RE. Alternatives to splenectomy in adults after trauma. *Am J Surg* 1982; 144(6):711-6.
12. Oakes DD. Splenic trauma. *Curr Probl Surg* 1981; 18(6):341-401.
13. Liaunigg A, Kastberger C, Leitner W, Kurz ME, Bergmann ES, Seifriedsberger M, *et al.* Regeneration of autotransplanted splenic tissue at different implantation sites. *Cell Tissue Res* 1992; 269(1):1-11.
14. Sasaki K, Kiuchi Y, Sato Y, Yamamori S. Morphological analysis of neovascularization at early stages of rat splenic autografts in comparison with tumor angiogenesis. *Cell Tissue Res* 1991; 265(3):503-10.
15. Alves HJ, Viana G, Magalhães MM, Arantes RME, Coelho PMZ, Cunha-Melo JR. Kinetics of neovascularisation of splenic autotransplants in mice. *J Anat* 1999; 195:387-92.

16. Tavassoli M, Ratzan RJ, Crosby WH. Studies on regeneration of heterotopic splenic autotransplants. *Blood* 1973; 41:701-9.
17. Iinuma H, Okinaga K, Sato S, Tomioka M, Matsumoto K. Optimal site and amount of splenic tissue for autotransplantation. *J Surg Res* 1992; 53:109-16.
18. Thalhamer J, Leitner W, Kuraz ME, Liaunigg A, Seifriedsberger M, Bergmann ES, *et al.* Immunoarchitecture and specific functions of splenic autotransplants at different implantation sites. *Eur Surg Res* 1992; 24(1):22-36.
19. Pabst R, Reilmann H. Regeneration of heterotopically transplanted autologous splenic tissue. *Cell Tissue Res* 1980; 209(1):137-43.
20. Patel JM, Williams JS, Nain JO, Hinshaw JR. The effect of site and technique of splenic tissue reimplantation on pneumococcal clearance from the blood. *J Pediatr Surg* 1986; 21:877-80.
21. Pabst R, Westermann J. Regeneration of autotransplanted splenic tissue is not proportional to total weight and size of transplanted fragments. *Pediatr Surg Int* 1987; 2(3):161-3.
22. Chappell JS. Splenic preservation. *S Afr Med Jr* 1984; 65(1):12-4.
23. Cooney DR, Dearth JC, Swanson SE, Dewanjee MK, Telander RL. Relative merits of partial splenectomy, splenic reimplantation, and immunization in preventing postsplenectomy infection. *Surgery* 1979; 86(4):561-9.
24. Van Wyck DB, Witte MH, Witte CL, Thies AC Jr. Critical splenic mass for survival from experimental pneumococemia. *J Surg Res* 1980; 28(1):14-7.
25. Marques RG, Petroianu A. Distribuição de *Escherichia coli* nos órgãos do sistema mononuclear fagocitário após esplenectomia total isolada ou combinada com auto-implante esplênico em rato. *Rev Col Bras Cir* 2003; 30(5):330-6.
26. Marques RG, Petroianu A, De Oliveira MBN, Bernardo-Filho M, Boasquevisque EM, Portela MC. Bacterial clearance after total splenectomy autotransplantation in rats. *Appl Radiat Isot* 2002, 57 (6), pp. 767-771.
27. Marques RG, Petroianu A, Coelho JM. Bacterial phagocytosis by macrophage of autogenous splenic implant. *Braz J Biol* 2003; 63(3):1-4.
28. Marques RG, Petroianu A, Coelho JM, Portela MC. Morfologia e função fagocitária de implante esplênico autógeno regenerado em ratos. *Acta Cir Bras* 2004; 19(6): 642-8.
29. Malangoni MA, Dawes LG, Droege EA, Rao AS, Collier D, Almagro UA. Splenic phagocytic function after partial splenectomy and splenic autotransplantation. *Arch Surg* 1985; 120(3):275-8.

30. Petroianu A, Barbosa AJA. Splenic preservation based on preserved histology and phagocytic function using upper short gastric vessels. *Am J Surg* 1995; 170(6):702.
31. Petroianu A, da Silva RG, Nascimento-Cardoso V, Alberti LR, da Silva MG. Effect of spleen surgeries on *Escherichia coli* distribution on the mononuclear phagocytic system. *Int J Surg* 2010; 8(1):48-51.
32. Bertolotto M, Gioulis E, Ricci C, Turollo A, Convertino C. Ultrasound and Doppler features of accessory spleens and splenic grafts. *Br J Radiol* 1998; 71(846):595-600.
33. Marques RG, Petroianu A, Coelho JM. Regeneration of phagocytic function after splenic autotransplantation. *Biom Res (Aligarh)* 2002; 13(1):15-8.
34. Weber T, Hanisch E, Baum RP, Seufert RM. Late results of heterotopic autotransplantation of splenic tissue into the greater omentum. *World J Surg* 1998; 22(8):883-9.
35. Cesta MF. Normal structure, function, and histology of the spleen. *Toxicol Pathol* 2006; 34(5):455-65.
36. Montes GS. Structural biology of the fibres of the collagenous and elastic systems. *Cell Biol Int* 1996; 20: 15-27.
37. Weigert, C. Ueber eine Methode zur Färbung elastischer Fasern *Zentbl Allg Path Path Anat* 1898; 9: 289-92.
38. Sakai LY, Keene DR, Engvall E. Fibrillin, a new 350-kD glycoprotein, is a component of extracellular microfibrils. *J Cell Biol* 1986; 103: 2499-509.
39. Fullmer HM, Lillie RD. The oxitalan fibers: a previously undescribed connective tissue fiber. *J Histochem Cytochem* 1958; 6: 425-30.
40. Gawlik Z. Morphological and morphochemical properties of the elastic system in the motor organ of man. *Folia Histochem Cytochem* 1965; 3(3):233-51.
41. Madewell, BR. Cellular proliferation in tumors: a review of methods, interpretation, and clinical applications. *J Vet Int Med* 2001; 15: 334-40.
42. Peña LL, Nieto AI, Pérez-Alenza D, Cuesta P, Cataño M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary Tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest* 1998; 10: 237-46.
43. Magga G, Hübscher U. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *J Cell Sci* 2003; 116: 3051-60.
44. Porter AG, Jänicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999, 6: 99-104.

45. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116:205-19.
46. Ramirez F. Pathophysiology of the microfibril/elastic fiber system: introduction. *Matrix Biol* 2000; 19:455-6.
47. Tamura K, Fukuda Y, Ishizaki M, Masuda Y, Yamanaka N, Ferrans VJ. 1995. Abnormalities in elastic fibers and other connective-tissue components of floppy mitral valve. *Am Heart J* 1995 129:1149-58.
48. Marques RG, Morales MM, Petroianu A. Brazilian law for scientific use of animals. *Acta Cir Bras* 2009; 24(1):69-74.
49. Mandarim-de-Lacerda CA, Fernandes-Santos C, Aguila MB. Image analysis and quantitative morphology. *Methods Mol Biol* 2010; 611:211- 225.
50. Petroianu A, Resende V, Silva RG. Late follow-up of patients submitted to subtotal splenectomy: late clinical, laboratory, imaging and functional with preservation of the upper splenic pole. *Int J Surg* 2008; 6(3): 247-52.
51. Mantovani M, Fontelle S, Fraga GP, Meirelles GV. Trauma abdominal fechado. Tratamento não operatório das lesões esplênicas. *Rev Para Med* 2002; 16 (2):46-51.
52. Marques RG, Petroianu A, Coelho JMCO, Portela MC. Regeneration of splenic autotransplants. *Ann Hematol* 2002; 81(11):622-6.
53. Esposito TJ, Gamelli RL. Injury to the spleen. In: Mattox KR, Feliciano DU, Moore EE. *Trauma*. 4th ed. New York: International Edition. 2000; cap 31, p. 683-710.
54. Petroianu A, Vidigal FM, Costa VC, Oliveira SC. Splenic autotransplantation in Gaucher's disease. *Dig Surg* 2000; 17(2):181-3.
55. Thalhamer J, Pimpl W, Pattermann M. The role of the spleen and splenic autotransplants in clearing experimental bacteremia caused by the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Res Exp Med* 1986; 186(3):229-38.
56. Malagó R, Reis NS, Araújo MR, Andreollo NA. Late histological aspects of spleen autologous transplantation in rats. *Acta Cir Bras* 2008; 23(3):274-81.
57. Torres OJM, Salazar SMR, Malafaia O. Autotransplante esplênico – Técnica cirúrgica. *J Bras Med* 1994; 67(3):176-8.
58. Pabst R. Regeneration of autotransplanted splenic fragments: basic immunological and clinical relevance. *Clin Exp Immunol* 1999; 117(3): 423-4.
59. Velcek FT, Jongco B, Shaftan GW. Posttraumatic splenic replantation in children. *J Pediatr Surg* 1982; 17: 879-83.

Apêndice - Splenic autotransplant regeneration in rats: morphofunctional and immunohistochemical evaluation.

Splenic autotransplant regeneration in rats: morphofunctional and immunohistochemical evaluation.

Valesca Oliveira de Sousa¹, Ruy Garcia Marques^{2*}, Jorge José de Carvalho³, Carlos Eduardo Rodrigues Caetano¹, Érica Lima¹, Rodrigo Neto Ferreira⁴, Vinicius Rocha⁴

¹Laboratory of Experimental Surgery, State University of Rio de Janeiro, Brazil

²Department of General Surgery, State University of Rio de Janeiro, Brazil

³Department of Histology and Embriology, State University of Rio de Janeiro, Brazil

⁴Laboratory of Human Experimental Biology, State University of Rio de Janeiro, Brazil

Running title: Splenic autotransplant regeneration

This work was partially supported by a grant from *Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro* (FAPERJ), Brazil.

* Corresponding author:

Ruy Garcia Marques, MD, PhD

Rua Clóvis Salgado 255 / 204

Recreio – Rio de Janeiro, RJ

22795-230 – Brazil

ABSTRACT

The aim of the present study was to assess the morphological and functional regeneration of an autotransplanted splenic tissue. Male Wistar rats (n=112) were randomly allocated into 16 groups (n=7) and subjected to total splenectomy followed by splenic autotransplantation. During 16 weeks, blood was collected weekly to evaluate the presence of Howell-Jolly bodies (functional evaluation). The number of Howell-Jolly bodies decreased progressively from the eighth week, and they were absent at the sixteenth week. Full morphological regeneration of the autotransplanted tissue was found starting at the eighth week, characterized by intense elastogenesis. Cell proliferation increased after the second week, and the highest density was seen at the ninth and tenth weeks (assessed by proliferating cell nuclear antigen [PCNA] immunohistochemistry). On the other hand, caspase-3 immunostain was only found at the first weeks of experiment indicating apoptosis. The present data show that there is morphological regeneration of the autotransplanted spleen after eight weeks of splenic autotransplantation. It results in a morphologically normal spleen, and matches the initiation of its functional regeneration.

Key-words: autotransplant, spleen, regeneration, Howell-Jolly body.

INTRODUCTION

Heterotopic splenic autotransplantation seems to be the best approach to preserve the splenic tissue when total splenectomy is necessary. It is based on observations from spontaneous splenic implants, called as splenosis, characterized by morphological and functional regeneration of the spleen after injury-induced splenectomy Patel et al. (1981); Oakes et al. (1981); Millikan et al. (1982); Resende et al. (2001).

After transplantation, the splenic tissue undergoes a wide necrosis and then passes through a process of regeneration. It starts at the peripheral layer, from three to four cells that remain viable. These cells proliferate in a centripetal direction and unlike cells located at the core of the tissue they gradually replace the necrotic zone. Regeneration seems to develop as described: a necrotic area appears few hours after transplantation, followed by activation and the onset of a new tissue (days after transplantation), there is the formation of the red and white pulp (about five weeks after transplantation), and then the final structure is established (eight weeks after transplantation) Liaunigg et al. (1992).

Several regions were tested for splenic autotransplantation such as the greater omentum, subcutaneous tissue, small bowel mesentery, intramuscular, and retroperitoneal Liaunigg et al. (1992); linuma et al. (1992). Studies in rats have shown that intraperitoneal transplants regenerate and function better than retroperitoneal and subcutaneous one. On the other hand, spleen transplantation to both omentum and subcutaneous tissue in rats results in a regeneration that is similar to the normal spleen tissue concerning morphology, but it is functionally different Pabst et al. (1980); Liaunigg et al. (1992);

In humans, some studies have shown that several spleen functions are reestablished after total splenectomy procedures that are followed by heterotopic splenic autotransplantation. Among the preserved functions are the ability to remove colloidal substances from the bloodstream, as well as altered erythrocytes and body inclusions such as the Howell-Jolly bodies, Heinz and Pappenheimer Patel et al. (1981); Pabst et al. (1987); Weber et al. (1998); Resende et al. (2001).

Elastogenesis has been the focus of many studies concerned with the ontogenetic development, since elastic fibers belong to the elastic-microfibril system that supports

tissues and organs. Moreover, their elastic properties give movement to tissues and allow growth Tamura et al. (1995); Ramirez et al. (2000).

Immunohistochemical procedures using monoclonal antibodies have been of great value to recognize antigens expressed by proliferating cells Madewell et al. (2001). To proliferate, cells must undergo a complex process, the cell cycle. The proliferating cell nuclear antigen (PCNA) belongs to the DNA sliding clamp family of proteins that facilitates the binding of the polymerase to the DNA strand during replication, a step necessary for genome duplication. PCNA has also a role on other proteins engaged in a number of processes related to DNA, such as DNA repair and replication, the control of cell cycle, chromatin metabolism, gene expression and apoptosis Magga et al. (2003).

Recent studies have shown that caspase activation is a specific marker of programmed cell death. Moreover, the identification of caspase-3 as a final effector agent makes its detection valuable and extremely sensitive to apoptosis Porter et al. (1999); Danial et al. (2004).

Unfortunately, medical literature is still scant regarding a full description of the splenic regeneration process, both morphologically and functionally, as well as data regarding the synthesis of the elastic extracellular matrix is lacking.

Thus, it is of relevance the qualitative and quantitative analysis of the development of the regeneration process morphologically, and the depuration of Howell-Jolly bodies as well, in rats submitted to total splenectomy followed by splenic autotransplantation.

METHODS

Handling and experimental protocols were approved by local Ethics Committee for the Use and Care of Experimental Animals. This study was conducted in accordance with the guideline of "Care and Use of Laboratory Animals" (US National Institutes of Health 85-23, revised 1996) Marques et al. (2009).

Male Wistar rats (n=112), two to three months-old, with an average body mass of 221.0 ± 3.0 g were used. Animals were housed in an acclimatized animal care, with 12h dark-light cycle, in appropriated cages. Water and rodent chow were offered *ad libitum* during the whole experiment.

Rats underwent total splenectomy followed by splenic autotransplantation, and then

they were allocated into 16 groups (n=7). Each group represents a specific time-point of evaluation after the surgery (in weeks), in such a way that each group (16 groups) represents one week after the surgery.

After six hour of fasting, animals were submitted to the surgical procedure under anesthesia (ketamine 35 mg/kg plus xylazine 5 mg/kg, ip). Once anesthetized, rats underwent abdominal trichotomy followed by antisepsis with iodopovidine and then drapes were affixed.

The spleen was carefully removed after a 3 cm incision at the supraumbilical median line, weighed and then sectioned transversally into five fragments of 2 mm of thickness. The fragments corresponded to the total mass of the tissue, and they were autotransplanted to the greater omentum, with continuous suture, using polyglycolic acid 4-0. Suture was done in an alternated fashion so that the omentum and the splenic tissue were able to stay in close contact. Laparorrhaphy was made by continuous suture, in two planes (peritoneum aponeurotic and skin) with a polyglycolic acid 3-0. After blood collection, rats were killed by anesthetic overdose with pentobarbital intraperitoneal.

Howell-Jolly body quantification

Howell-Jolly bodies were quantified in ten different microscopic fields for each stained slide. Each field contained 100 erythrocytes, summing 1,000 erythrocytes per slide.

Light microscopy

Fragments from the spleen were fixated in phosphate buffered formaldehyde 4% (0,1M, pH 7,2) for 48 hours at room temperature, and then processed and embedded in Paraplast Plus (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) according to the histological routine for light microscopy. Then, the tissue was sectioned at 5 μ m thick, and the sections were stained with hematoxylin and eosin (HE, gross observation of tissue morphology), and Weigert's resorcine-fuchsin (elastic fiber system).

Immunohistochemistry

The immunoperoxidase technique was applied using specific antibodies to immunostain the PCNA (to visualize proliferating cells), and caspase-3 (to highlight apoptotic cells).

Morphometry

The analysis of PCNA and caspase-3 stained sections was performed using the software Image-Pro® Plus version 5.0 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA). Digital images were acquired as TIFF, 36-bit color, 1,280 x 1,024 pixels, using a LC Evolution camera coupled to an Olympus BX51 microscope. Five non-consecutive random digital images of the regenerated splenic tissue were acquired per animal Mandarim-de-Lacerda et al. (2010).

Statistical analysis

Data are shown as mean \pm SEM. Differences between groups were tested using one-way Analysis of Variance (ANOVA) followed by the post-hoc test of Tukey. All data analysis and graphics were made by the GraphPad Prism version 5.0 for Windows (GraphPad Software, San Diego, California, EUA). In all cases, a $P < 0.05$ was considered to reject the null hypothesis of similarity between groups.

RESULTS

Body mass

Body mass was 221.0 \pm 3.0 g at the beginning of the experiment. At the sixteenth week, body mass was significantly increased compared to the first week due to aging (324.0 \pm 49.0 g, $P < 0.0001$) (Fig. 1).

Splenic mass

One week after autotransplantation, the weight of the regenerated spleen was significantly lower compared with its weight when it was autotransplanted (less 10%). Then, spleen weight increased progressively, gaining about 13%, 15%, 20%, 21% and 28% at the third, fifth, eighth, twelfth and sixteenth weeks, respectively, when compared to spleen weight at the first week of transplantation (Fig. 2).

Light microscopy

Hematoxylin and eosin (HE)

Lymphocyte infiltration was found at the first week after spleen autotransplantation, representing a residual tissue from the autotransplanted spleen (Fig. 3A). At the third week, there were focal sites containing lymphocytes, characterizing the initial formation of lymphoid follicles, which consisted of red pulp, erythrocytes and sinusoids (Fig. 3B). At the fifth week (Fig. 3C), it was observed the presence of lymphoid follicles without a central arteriole and splenic sinusoids filled with erythrocytes. Follicles in advanced development were seen at the eighth week (Fig. 3D), since the central artery was present, as well as the red pulp was filled with erythrocytes. The density of lymphoid follicles was increased by the twelfth week (Fig. 3E), but they were smaller in size when compared to more immature follicles. Finally, at the sixteenth week lymphoid follicles were bigger compared with previous weeks, and also better developed resembling the histological features of a new spleen (Fig. 3F).

Weigert's resorcin-fuchsin

Capsule and trabeculae rich in elastic system fibers were identified at the first week after splenic autotransplantation, and they projected towards the core of the organ (Fig. 4A). At the third week, there was diffuse elastogenesis in the parenchyma of the autotransplanted tissue (Fig. 4B). Elastic system fibers were found in the capsule and trabeculae at the fifth week (Fig. 4C), but they were still poorly developed. At the eighth week, elastic fibers were spread throughout the entire parenchyma (Fig. 4D), and the capsule region had the greatest amount of fibers from the elastic system at the twelfth week (Fig. 4E). Finally, supporting fibrous and elastic tissue was found

throughout the whole parenchyma of the newly formed splenic tissue at the sixteenth week.

Immunostain

Anti-PCNA

Immunopositive PCNA cells were found in the splenic autotransplants along the sixteenth weeks of experiment, but not at the first week. After the second week, the density of PCNA-stained cells increased progressively. The highest density was found at both ninth and tenth weeks, when the density of PCNA-stained cells was 67% and 68% higher compared with the other weeks ($P < 0.0001$, Figs. 5-6).

Anti-Caspase-3

The highest density of caspase-3 immunostained cells was detected at the first week ($P < 0.01$), compared with the other weeks. A significant decrease in caspase-3 immunostain was found at the second week (less 27%) and following weeks (less 42% at the third week), reaching 93% and 94% at the ninth and tenth weeks, respectively, when compared with the first week after splenic autotransplantation (Figs. 7-8).

Functional regeneration

Howell-Jolly bodies were found in the blood of splenectomized rats, 3% until the fifth week, and then it decreased to 2%. There were 1% of Howell-Jolly bodies at the eighth week, and this percentage was maintained until the twelfth week. Howell-Jolly bodies were no longer found at the sixteenth week (Fig. 9).

DISCUSSION

Since the spleen is an important organ regarding body defense, a number of clinical and experimental studies have been conducted seeking its preservation. It has been recommended the use of haemostatic and buffering substances, partial and subtotal

splenectomy, and sutures Petroianu et al. (2008); Mantovani et al. (2002). When none of the mentioned types of preservation are available and total splenectomy is necessary, the only alternative seems to be splenic autotransplantation Esposito et al.; (2000); Marques et al. (2002); Mantovani et al. (2002).

Some studies have demonstrated that in the appropriated location, the splenic autotransplant is able to regenerate after a period of necrosis. It recovers the microscopic characteristics of a normal spleen, such as the presence of red and white pulp, and also allow the tissue to recover some of its functions Tavassoli at al. (1973); Patel et al. (1986); Marques et al. (2002).

In the present study, the morphological regeneration of the splenic autotransplant began at the eighth week, characterized by red and white pulp consisted of germinative center and central arteriole, ratifying the findings of Van Wyck et al. (1980). On the other hand, Tavassoli et al. (1973) and linuma et al. (1992) showed complete morphological regeneration five and sixteen weeks after autotransplantation.

At the first week of experiment, there was a cluster of lymphocytes of follicle appearance that were strongly stained by caspase-3, representing cells undergoing apoptosis Porter et al. (1999); Danial et al. (2004). Since PCNA immunostain was not seen—a marker of cell proliferation—elastogenesis signs were not detected as well, but only few elastic system fibers at the capsule and trabeculae Magga et al. (2003). Thus, we believe that both lymphocytes and fibers belonged to the autotransplanted spleen instead of being a new splenic tissue under development.

Considerable caspase-3 immunostain is still present in focal clusters of lymphocytes at the third week, suggesting apoptosis. PCNA immunostain is weak, thus splenic remodeling of the white and red pulps is modest, and it corroborates with the weak staining for elastic and fibrous tissue.

At the fifth week, single lymphoid follicles without a central arteriole were noticed. They were segregated from the adjacent red pulp, which was filled with erythrocytes inside the splenic sinusoids. The immunostain for caspase-3 showed that there was a significant decrease in the amount of apoptotic cells compared with the first four weeks. Whereas the process of apoptotic degeneration decreased, PCNA immunostain increased. These results show that spleen remodeling at the cellular level is progressive for lymphocytes and red pulp elements as well, and it is consistent with the increase in weight of the autotransplanted parenchyma.

Elastogenesis also increased during this same period.

At the eighth week, it is of note the increased PCNA immunostain of the lymphoid follicles during parenchyma development, and it is significantly different from what we saw in the previous weeks. It is also of note the differentiation of the follicle arteriole, and then the full differentiation of the splenic white pulp. Similarly, caspase-3 immunostain is significantly decreased, reinforcing the beneficial remodeling of the spleen. The red pulp also differentiates since its sinusoids are filled with erythrocytes, and elastogenesis is continuous as trabeculae growth.

The number of lymphoid follicles was increased by the twelfth week, but they were smaller in size compared to follicles from previous weeks. This relative diminishment of the white pulp was also reported by other researchers (Thalhamer et al., 1986, 1992); Marques et al. (2002). PCNA immunostain decreased significantly compared with the ninth and tenth weeks, which are the weeks when cell proliferation reaches its peak in the new spleen parenchyma. Moreover, caspase-3 immunostain is completely absent, and remains very low until the end of the experiment. Elastogenesis also stabilizes, and trabeculae do not increase. These features obtained from immunohistochemistry lead to the observation that the modifications related to the morphological remodeling are maintained in the new spleen.

At the sixteenth week, PCNA immunostain is not observed and follicles have features similar to a normal spleen. Histological features are maintained and morphological changes as seen in the twelfth week are no longer seen.

There are a number of authors discussing spleen regeneration, but medical literature is scant about information regarding the detailed description of the cellular and extracellular matrix events during the progress of spleen regeneration after splenic autotransplantation Petroianu et al. (2008); Mantovani et al. (2002). Therefore, we understand that the present data represents an important contribution to build a new knowledge in this field of study.

In the present work we choose the greater omentum for splenic autotransplantation, taking into account several studies claiming the omentum as the most appropriated location to the process of splenic regeneration Cooney et al. (1979); (Marques et al., 2003, 2004). Positive results may be due to the dense drainage of this tissue towards the hepatic portal vein, which seems to be a crucial determinant to the recovery of spleen function Tavassoli et al. (1973); Pabst et al. (1980); Liaunigg et al. (1992); Thalhamer et al. (1992).

Marques et al. (2003, 2004) saw that after splenic autotransplantation (fragment about 2 mm) to the greater omentum in rats, the fragment acquired the micro and macro architecture of a normal spleen, of lesser dimension, and with preserved phagocytic function of bacteria. Corroborating with this study, Malagó et al. (2008) concluded after twenty four weeks of observation that the omentum but not the mesentery neither the peritoneal cavity is the best location to fixate the splenic autotransplant, and it preserves the spleen function of body defense. The evolution of the transplant was analyzed macro and microscopically. The histological study evaluated quantitative and qualitative criteria, whereas the functional evaluation enclosed lymphocyte counting as well as the counting of activated macrophages phagocytizing hemosiderin, plasma cells, fibroblasts, fibrocytes, giant cells, monocytes, interstitial space and collagen fibers.

In the present study, splenic autotransplantation to the greater omentum consisted of five fragments of 2 mm each. Torres et al. (1994) found that small fragments of 3 to 5 mm of thickness allow a wide contact to vessels of the greater omentum and preserve the sinusoidal structure of the spleen in rats. Corroborating with this study, Pabst (1999) found that thinner and smaller fragments present less necrosis after transplantation, because the diffusion distance for oxygen and nutrients is shorter, and then regeneration is set earlier Pabst et al. (1992).

The minimum size of the splenic mass to be autotransplanted should be of at least 25% Patel et al. (1981); Resende et al. (2001); Cadili et al. (2008), and the number of transplanted fragments does not seem to have any relationship Esposito et al. (2000). Despite the evidences, we choose to autotransplant the whole splenic mass because it is a routine procedure in the Laboratory of Experimental Surgery of the Faculty of Medical Sciences of the State University of Rio de Janeiro since 2001.

Based on the information that the regenerated mass depends on the minimum size transplanted Cooney et al. (1979); Chappell et al. (1984), it was observed 28% of regeneration at the sixteenth week of the splenic mass autotransplanted. Similar data was obtained by Marques *et al.* (2004), where the difference in the regenerated splenic mass in young and adult animals was 33% and 25% respectively, after total autotransplantation of the splenic mass at the same site and during the same period. Regarding gender, they found that female rats had a greater percentage of regenerated mass (46%) compared with male (23%). However, these data differs from linuma *et al.* (1992) that showed 35%, 67%, 75% and 80% of regeneration after

two, sixteen, twenty, and forty eight weeks, respectively, of autotransplantation of 50% of the splenic mass to the greater omentum.

The depuration of corpuscle inclusions has been demonstrated by searching the presence of Howell-Jolly bodies inside erythrocytes Pabst et al. (1980); Thalhamer et al. (1992); Alves (1999). In this study, relevant data was obtained regarding the functional regeneration of the splenic autotransplant by identifying the presence of these bodies in the peripheral blood of splenectomized animals.

There are a number of data from studies that evaluate the presence of Howell-Jolly bodies in the bloodstream after splenic autotransplantation. They show that these bodies disappear after four weeks Patel et al. (1986), to three and six months Velcek et al. (1982). Inuma *et al.* (1992) found that Howell-Jolly bodies disappear after sixteen weeks of autotransplantation in rats submitted to total splenectomy and splenic autotransplantation that were followed by forty eight weeks. They concluded that this is the time interval required for functional regeneration.

In the present study, the increased functional activity of the autotransplanted tissue, evidenced by the reduced Howell-Jolly body counting at the eighth week and maintained until the twelfth week, parallels the peak of PCNA expression (ninth and tenth weeks). The increased number of parenchyma cells might result in a greater functional ability to depurate, and it also correlates with the reestablishment of the morphological features of the autotransplanted tissue found after the eighth week of observation.

All in all, the present work represents an advance in the knowledge regarding the process of splenic autotransplant regeneration. Further studies using other histochemical and immunohistochemical techniques as well as using different animal species of different ages would be of great value for a better understanding of the regeneration process.

CONCLUSION

Present data show that there is morphological regeneration of the splenic autotransplant in the greater omentum of rats, beginning at the eighth week post-surgery, and it results in a morphologically healthy spleen and matches the initiation of its functional regeneration.

REFERENCES

1. Alves HJ, Viana G, Magalhães MM, Arantes RME, Coelho PMZ, Cunha-Melo JR:
Kinetics of neovascularisation of splenic autotransplants in mice.
J Anat 92; 195-387 (1999).
2. Chappell JS:
Splenic preservation.
S Afr Med Jr 65(1): 12-4 (1984).
3. Cooney DR, Dearth JC, Swanson SE, Dewanjee MK, Telander RL:
Relative merits of partial splenectomy, splenic reimplantation, and immunization in preventing postsplenectomy infection.
Surgery 86(4): 561-9 (1979).
4. Danial NN, Korsmeyer SJ:
Cell death: critical control points.
Cell 116: 205-19 (2004).
5. Esposito TJ, Gamelli RL: Injury to the spleen. In: Mattox *Trauma* (KR, Feliciano DU, Moore EE, 4th ed.), International Edition New York, 2000, (p. 683-710).
6. Iinuma H, Okinaga K, Sato S, Tomioka M, Matsumoto K:
Optimal site and amount of splenic tissue for autotransplantation.
J Surg Res 53: 109-16 (1992).
7. Liaunigg A, Kastberger C, Leitner W, Kurz ME, Bergmann ES, Seifriedsberger M, Weinlich D, Pimpl W, Thalhamer J:
Regeneration of autotransplanted splenic tissue at different implantation sites.
Cell Tissue Res 1992; 269(1):1-11
8. Madewell, B.R:
Cellular proliferation in tumors: a review of methods, interpretation, and clinical applications.
J Vet Int Med 15: 334-40 (2001).
9. Magga, G. Hübscher, U:
Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners.
J Cell Sci 116: 3051-60 (2003).

10. Malagó R, Reis NS, Araújo MR, Andreollo NA:
Late histological aspects of spleen autologous transplantation in rats.
Acta Cir Bras 23(3): 274-81(2008).
11. Mandarim-de-Lacerda CA, Fernandes-Santos C, Aguilá MB:
Image analysis and quantitative morphology.
Methods Mol Biol 611: 211- 225 (2010).
12. Mantovani M, Fontelle S, Fraga GP, Meirelles GV:
Trauma abdominal fechado. Tratamento não operatório das lesões esplênicas.
Rev Para Med 16 (2): 46-51 (2002).
13. Marques RG, Petroianu A, Coelho JMCO, Portela MC:
Regeneration of splenic autotransplants.
Ann Hematol 81(11): 622-6 (2002).
14. Marques RG, Petroianu A, Coelho JM:
Bacterial phagocytosis by macrophage of autogenous splenic implant.
Braz J Biol 63(3): 1-4 (2003).
15. Marques RG, Petroianu A, Coelho JM, Portela MC:
Morfologia e função fagocitária de implante esplênico autógeno regenerado em ratos.
Acta Cir Bras 19(6): 642-8 (2004).
16. Marques RG, Morales MM, Petroianu A:
Brazilian law for scientific use of animals.
Acta Cir Bras 24(1): 69-74 (2009).
17. Millikan JS, Moore EE, Moore GE, Stevens RE:
Alternatives to splenectomy in adults after trauma.
Am J Surg 144(6): 711-6 (1982).
18. Oakes DD:
Splenic trauma
Curr Probl Surg 18(6): 341-401 (1981).
19. Pabst R, Reilmann H:
Regeneration of heterotopically transplanted autologous splenic tissue.
Cell Tissue Res 209(1): 137-43 (1980).
20. Pabst R, Westermann J:

Regeneration of autotransplanted splenic tissue is not proportional to total weight and size of transplanted fragments.

Pediatr Surg Int 2(3): 161-3 (1987).

21. Pabst, R:

Regeneration of autotransplanted splenic fragments: basic immunological and clinical relevance.

Clin Exp Immunol 117(3): 423-4 (1999).

22. Patel JM, Williams JS, Shmigel B, Hinshaw JR:

Preservation of splenic function by autotransplantation of traumatized spleen in man.

Surgery 90: 683-8 (1981).

23. Patel JM, Williams JS, Nain JO, Hinshaw JR:

The effect of site and technique of splenic tissue reimplantation on pneumococcal clearance from the blood.

J Pediatr Surg 21: 877-80 (1986).

24. Petroianu A, Resende V, Silva RG:

Late follow-up of patients submitted to subtotal splenectomy: late clinical, laboratory, imaging and functional with preservation of the upper splenic pole.

Int J Surg 6(3): 247-52 (2008).

25. Porter, A.G.; Jänicke, R.U:

Emerging roles of caspase-3 in apoptosis.

Cell Death Differ 6: 99-104 (1999).

26. Ramirez F:

Pathophysiology of the microfibril/elastic fiber system: introduction.

Matrix Biol 19: 455-6 (2000).

27. Resende V, Petroianu A:

Estudo funcional tardio do auto-implante esplênico após trauma complexo do baço humano.

Rev Col Bras Cir 28: 165-70 (2001).

28. Tamura K, Fukuda Y, Ishizaki M, Masuda Y, Yamanaka N, Ferrans VJ:

Abnormalities in elastic fibers and other connective-tissue components of floppy mitral valve.

Am Heart J 129: 1149-58 (1995).

29. Thalhamer J, Pimpl W, Pattermann M:
The role of the spleen and splenic autotransplants in clearing experimental bacteremia caused by the gram-negative bacterium *Escherichia coli*.
Res Exp Med 186(3): 229-38 (1986).
30. Thalhamer J, Leitner W, Kuraz ME, Liaunigg A, Seifriedsberger M, Bergmann ES:
Immunoarchitecture and specific functions of splenic autotransplants at different implantation sites.
Eur Surg Res 24(1): 22-36 (1992).
31. Tavassoli M, Ratzan RJ, Crosby WH:
Studies on regeneration of heterotopic splenic autotransplants.
Blood 41: 701-9 (1973).
32. Torres OJM, Salazar SMR, Malafaia O:
Autotransplante esplênico – Técnica cirúrgica.
J Bras Med 67(3): 176-8 (1994).
33. Weber T, Hanisch E, Baum RP, Seufert RM:
Late results of heterotopic autotransplantation of splenic tissue into the greater omentum.
World J Surg 22(8): 883-9 (1998).
34. Velcek FT, Jongco B, Shaftan GW:
Posttraumatic splenic replantation in children.
J Pediatr Surg 17: 879-83 (1982).

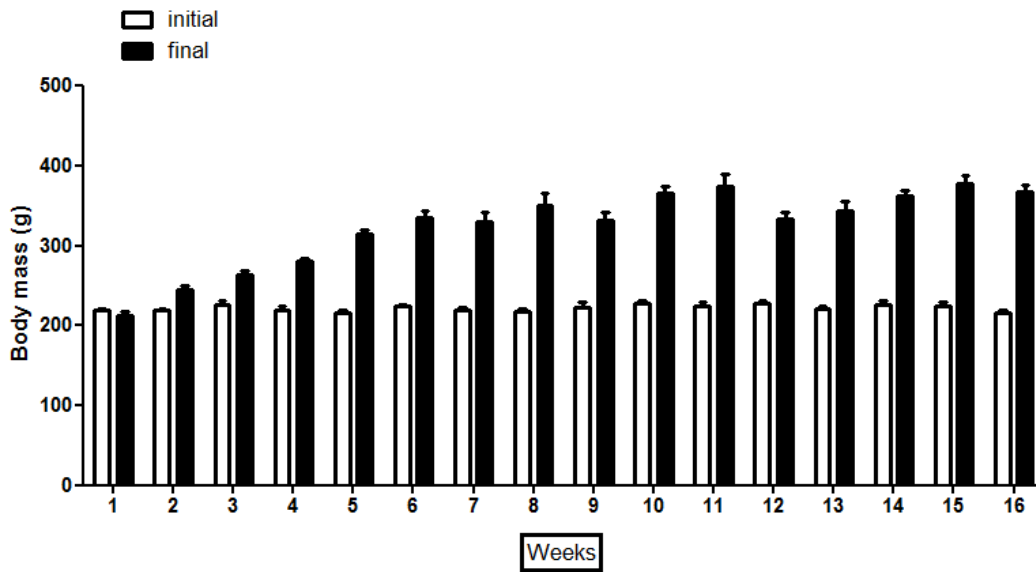


Fig. 1 – Body mass at the first (open bar) and last weeks (dark bar) of the experiment. At the sixteenth week, body mass was significantly increased ($P < 0.001$).

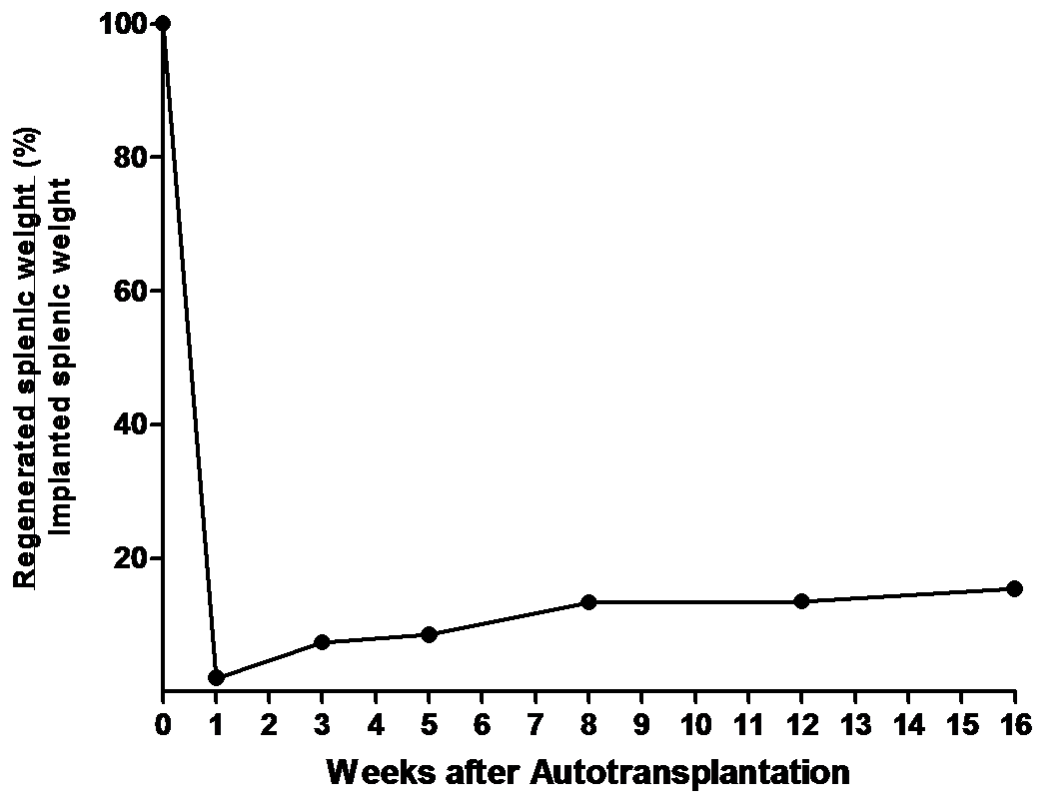


Fig. 2 – Evolution of the percentage of splenic mass regenerated based on the autotransplanted splenic mass.

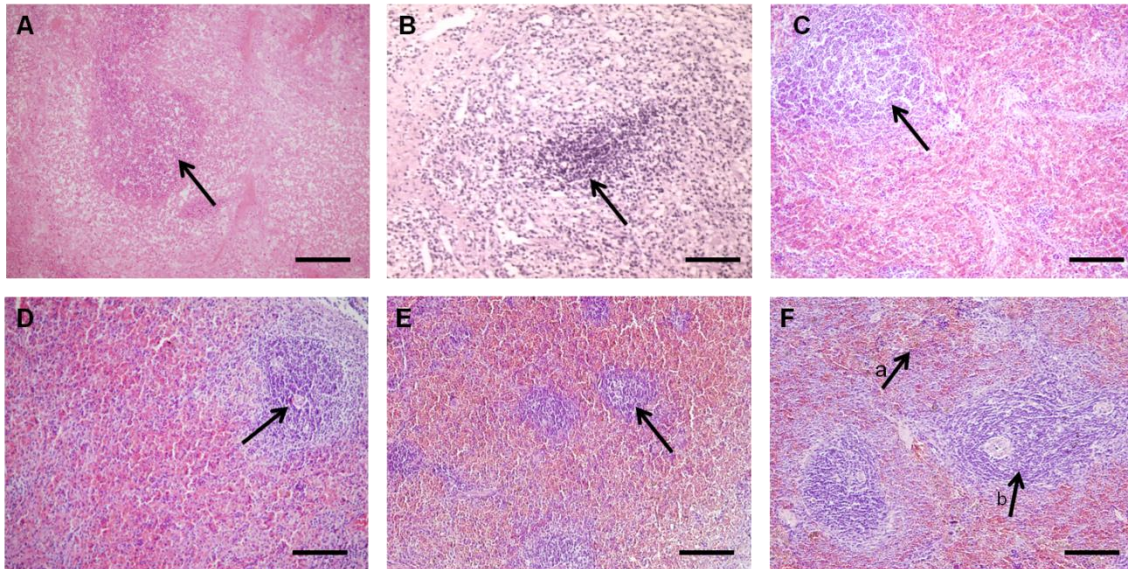


Fig. 3 – Photomicrographs of autotransplanted splenic mass in rat. A – 1st week, lymphocyte cluster with follicle appearance (arrow); B – 3rd week, lymphocytic infiltrate (arrow); C – 5th week, lymphoid follicle without central arteriole (arrow); D – 8th week, lymphoid follicle with central arteriole (arrow); E – 12th week, higher number of lymphoid follicles, but smaller in size (arrow) and; F – 16th week, red pulp and white pulp (arrow a and b, respectively). Hematoxylin and eosin stain. Barr: 50 µm.

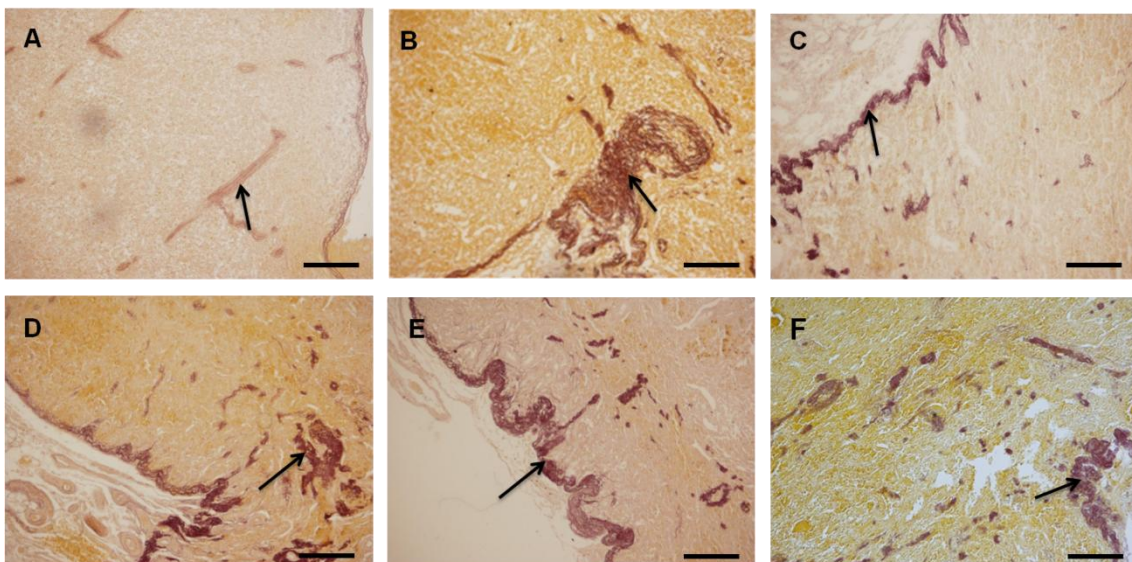


Fig. 4 – Photomicrographs of autotransplanted splenic mass in rat. Arrows indicate fiber bundles from elastic-microfibril system. A – 1st week; B – 3rd week; C – 5th week; D – 8th week; E – 12th week and; F – 16th week. Weigert's resorcine-fuchsin stain. Barr: 50 µm.

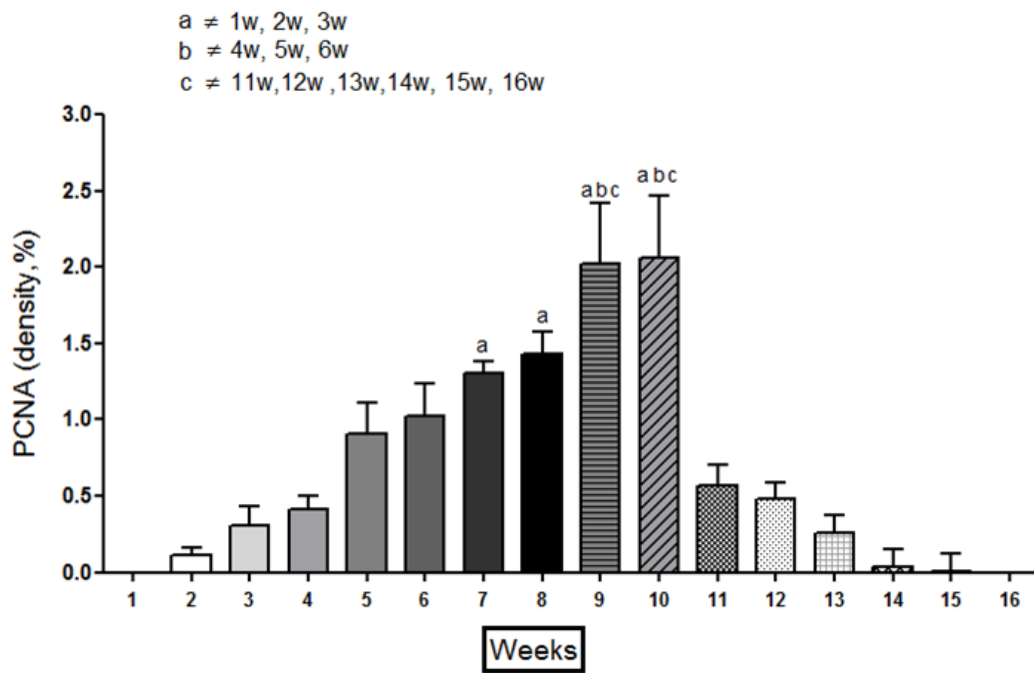


Fig. 5 – Variation of PCNA immunostain of the regenerated spleen along the sixteen weeks of the experiment. Symbols represent statistical difference with: [a] ≠ 1st, 2nd and 3rd weeks; [b] ≠ 4th, 5th and 6th weeks; [c] ≠ 11th, 12th, 13th, 14th, 15th, and 16th weeks ($P < 0.05$).

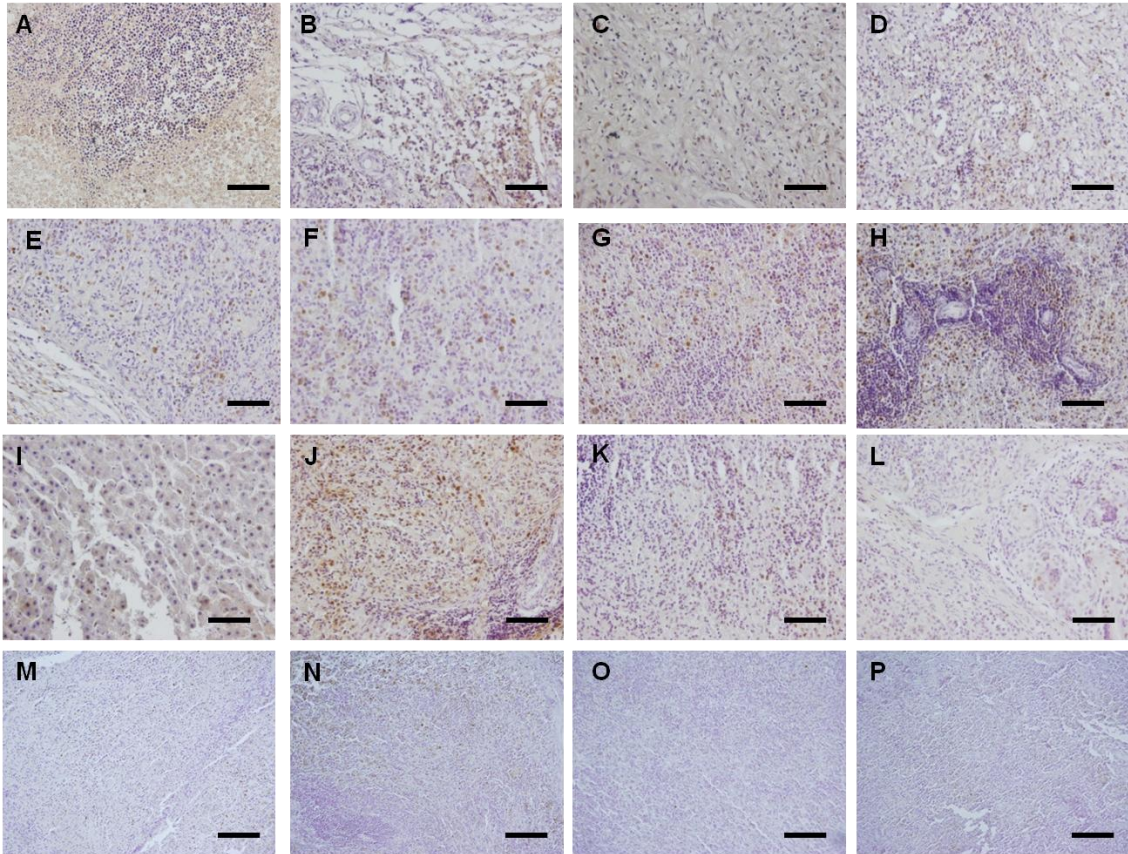


Fig. 6 – Photomicrographs of regenerated splenic autotransplants in rat, 1st week (A) to 16th week (P). PCNA immunostain. Barr: 50 μ m.

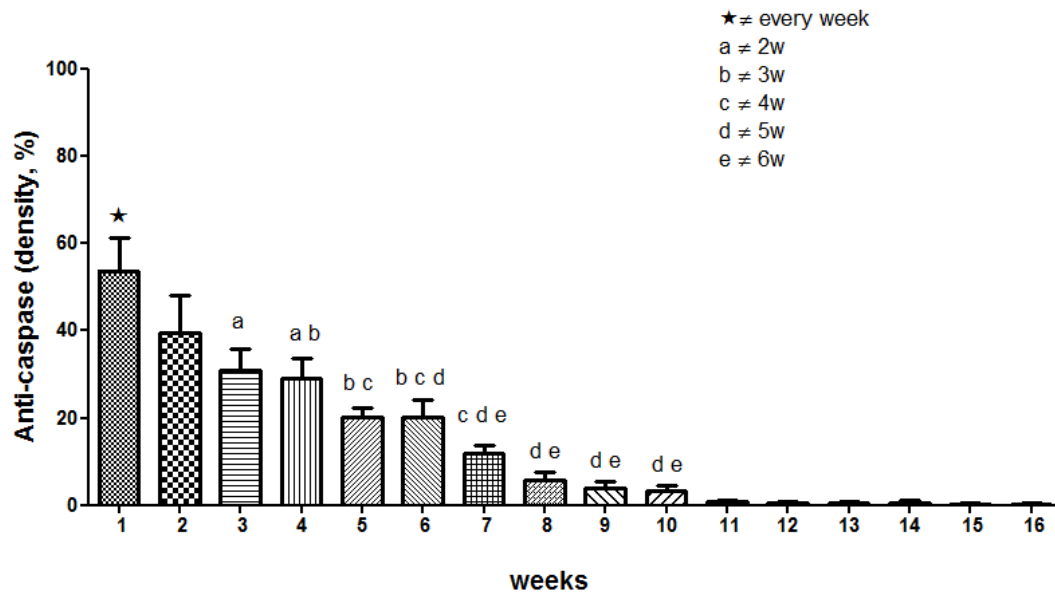


Fig.7 – Variation of caspase-3 immunostain in the regenerated splenic tissue along the sixteen weeks of experiment. Symbols represent statistical difference with: * ≠ all weeks; [a] ≠ 2nd week; [b] ≠ 3rd week; [c] ≠ 4th week; [d] ≠ 5th week and; [e] ≠ 6th week ($P < 0.05$).

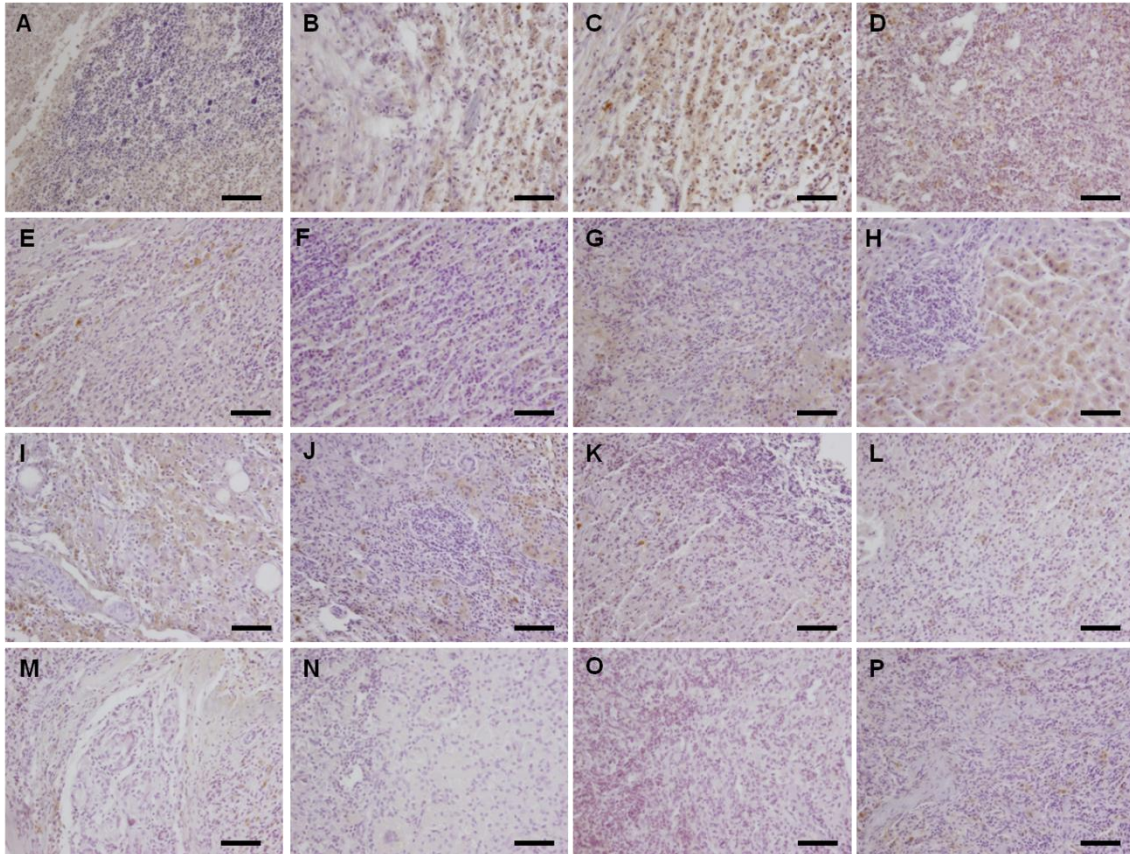


Fig. 8 – Photomicrographs of regenerated splenic autotransplants in rat, 1st week (A) to 16th week (P). Caspase-3 immunostain. Barr: 50 µm.

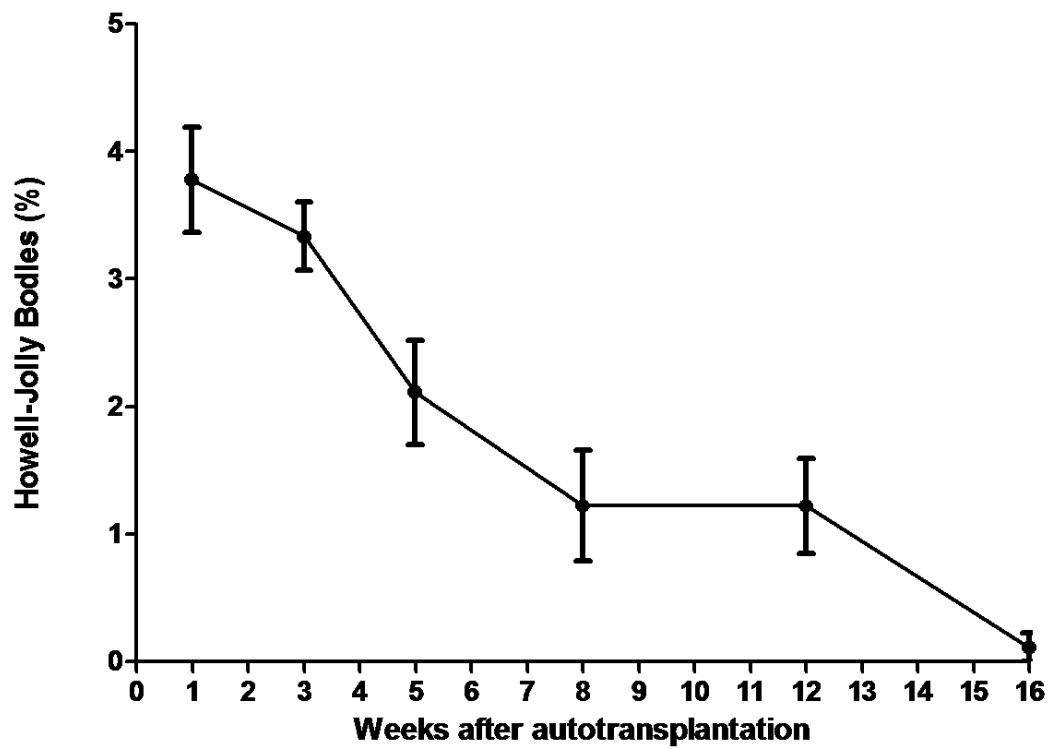


Fig. 9 – Howell-Jolly bodies assessment in peripheral blood smear of splenectomized rats with splenic autotransplants.

ANEXO – Técnicas laboratoriais

Processamento para Microscopia de Luz

Inclusão em parafina:

1. Lavar o material em H₂O corrente (1h)
2. Lavar em álcool 70% (1h)
3. Lavar em álcool 90% (1h)
4. Lavar em álcool 100% (1h)
5. Lavar em álcool 100% (1h)
6. Banho de xilol 1 (30 min)
7. Banho de xilol 2 (30 min)
8. Banho de parafina 1 (40 min)
9. Banho de parafina 2 (40 min)
10. Inclusão definitiva
11. Microtomia (5µm)

Coloração: Hematoxilina-Eosina

Procedimento:

1. Estufa 58°C (5min)
2. Desparafinar e hidratar os cortes
 - a. Xilol 1, xilol 2, álcool 100%, álcool 90%, álcool 70%, H₂O dest. (2min cada)
3. Hematoxilina (5min)
4. Lavar em H₂O corrente
5. Eosina (3min)
6. Lavar em H₂O corrente
7. Desidratar e diafanizar os cortes
 - a. Álcool 70%, álcool 90%, álcool 100%, Xilol 4, xilol 5, xilol 6
8. Montar a lâmina

Coloração: Resorcina Fucsina de Weighert sem Oxidação

Procedimento:

1. Estufa 58°C (5min)
2. Desparafinar e hidratar os cortes
 - a. Xilol 1, xilol 2, álcool 100%, álcool 90%, álcool 70%, H₂O dest. (2min cada)
3. Corar com Resorcina Fucsina (1h)
4. Lavar com álcool 90% (30seg)
5. Lavar com álcool 70% (30seg)
6. Lavar com H₂O destilada (30seg)
7. Corar com Orange G (30seg)
8. Desidratar e diafanizar os cortes
 - a. Álcool 70%, álcool 90%, álcool 100%, xilol 4, xilol 5, xilol 6
9. Montar a lâmina

Resultados:

Fibras elásticas e fibras elaunínicas → preto

Fibras colágenas e epitélio → laranja

Imunomarcção para PCNA

Procedimento:

1. Estufa 58°C (5min)
2. Desparafinar e hidratar os cortes
 - a. Xilol 1, xilol 2, xilol 3, álcool 100%, álcool 90%, álcool 70%, H₂O dest. (2min cada)
3. Câmara úmida
4. Peróxido de hidrogênio (15min)
5. Rinsar com H₂O (pissete)
6. PBS (3x 5min)
7. Tampão citrato pH6,0 – 60°C (20min) (recuperação antigênica)
8. PBS (3x 5min)
9. PBS/BSA 3% (20min)
10. Anticorpo primário (*overnight*); diluído em PBS/BSA 1%
11. PBS (3x 5min)
12. Anticorpo secundário biotinilado (*kit* LSAB2 ou invitrogen – 1h)
13. PBS (3x 5min)
14. Estreptavidina (do *kit* – 30min)
15. Escorrer
16. DAB (15seg a 1min)
17. H₂O dest. (2min)
18. Hematoxilina (1min)

19. H₂O dest. (2min)
20. Desidratar e diafanizar os cortes
 - a. Álcool 70%, álcool 90%, álcool 100%, xilol 4, xilol 5, xilol 6
21. Montar a lâmina

Imunomarcção para Caspase-3

Procedimento:

1. Estufa 58°C (5min)
2. Desparafinar e hidratar os cortes
 - a. Xilol 1, xilol 2, xilol 3, álcool 100%, álcool 90%, álcool 70%, H₂O dest. (2min cada)
3. Câmara úmida
4. Peróxido de hidrogênio (15min)
5. Rinsar com H₂O (pissete)
6. PBS (3x 5min)
7. Tampão citrato pH6,0 – 60°C (20min) (recuperação antigênica)
8. PBS (3x 5min)
9. PBS/BSA 3% (20min)
10. Anticorpo primário (*overnight*); diluído em PBS/BSA 1%
11. PBS (3x 5min)
12. Anticorpo secundário biotilado (kit LSAB2 ou invitrogen – 1h)
13. PBS (3x 5min)
14. Estreptavidina (do *kit* – 30min)
15. Escorrer
16. DAB (15seg a 1min)
17. H₂O dest. (2min)
18. Hematoxilina (1min)
19. H₂O dest. (2min)
20. Desidratar e diafanizar os cortes
 - a. Álcool 70%, álcool 90%, álcool 100%, xilol 4, xilol 5, xilol 6
21. Montar a lâmina